

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
27 mai 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/044204 A2**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**C12N 15/13, C07K**  
16/18, C12N 15/63, 1/21, G01N 33/53, A61K 39/395,  
A61P 25/28, C07K 14/47, G01N 33/68

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/003319

(22) Date de dépôt international :  
6 novembre 2003 (06.11.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/13866 6 novembre 2002 (06.11.2002) FR

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28 rue du Docteur Roux, F-75724 Paris cedex 15 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel-Ange, F-75794 Paris cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : ROUGEON, François [FR/FR]; 36 rue Fontaine, F-92310 Sèvres (FR). LAFAYE, Pierre [FR/FR]; 31 Boulevard Camelinat, F-92240 MALAKOFF (FR).

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

A2

WO 2004/044204

(54) Title: VARIABLE FRAGMENTS OF SINGLE-CHAIN CAMELIDE ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR DIAGNOSING AND TREATING VARIOUS PATHOLOGIES

(54) Titre : FRAGMENTS VARIABLES D'ANTICORPS DE CAMELIDES A CHAINE UNIQUE ET LEURS APPLICATIONS POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIVERSES.

(57) Abstract: The invention concerns variable fragments of single-chain camelide antibodies and uses thereof for diagnosing and treating various pathologies associated with molecules identified by said antibodies.

(57) Abrégé : Fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique ainsi que leurs applications pour le traitement ou le diagnostic des pathologies associées aux molécules reconnues par ces anticorps.

**FRAGMENTS VARIABLES D'ANTICORPS DE CAMELIDES A CHAINE  
UNIQUE ET LEURS APPLICATIONS POUR LE DIAGNOSTIC ET LE  
TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIVERSES**

La présente invention est relative à des fragments variables d'anti-corps de camélidés à chaîne unique ainsi qu'à leurs applications pour le traitement ou le diagnostic des pathologies associées aux molécules reconnues par ces anticorps.

De manière plus précise, la présente invention est relative à :

- des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, qui ne secrètent pas de toxines et plus particulièrement à des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre au moins une molécule d'adhésion et notamment la phosphorylcholine (VHH-anti-phosphorylcholine) associée aux surfaces des agents pathogènes retrouvées dans les infections mucosales ainsi qu'à leurs applications dans le diagnostic et le traitement des maladies infectieuses correspondantes ;
- des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 ( $A\beta$ 42) (VHH- $A\beta$ 42), ainsi qu'à leurs applications pour le diagnostic et le traitement de pathologies non infectieuses comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes (produits dérivés de constituants cellulaires comme des produits dérivés de protéines insolubles), et plus particulièrement pour le diagnostic et le traitement des maladies neuroagrégatives comme la maladie d'Alzheimer.

Au sens de la présente invention, on entend par :

- maladies infectieuses, des maladies induites par des agents pathogènes (virus ou bactéries), à l'exclusion des bactéries productrices de toxines ;
- de manière plus précise, il s'agit d'infections mucosales, dans lesquelles on observe l'expression, à la surface des bactéries induisant lesdites infections, d'au moins une molécule d'adhésion et notamment de phosphorylcholine.
- maladies non-infectieuses dans lesquelles on observe un dépôt de substances amyloïdes insoluble, notamment les maladies suivantes : des maladies chroniques inflammatoires, le myélome multiple, la macroglobulinémie, la poly-neuropathie amyloïde familiale, la cardiomyopathie familiale, l'amylose sénile systémique, la polynéphropathie amyloïde familiale, l'amylose familiale, le syndrome

de Gerstmann-Straussler-Scheinker, la néphropathie amyloïde familiale avec urticaire et surdité (syndrome de Muckle-Wells), le carcinome médullaire de la thyroïde, le dépôt amyloïde isolé des auricules, l'amylose associée à l'hémodialyse (HAA) et les maladies neuroagrégatives ou neurodégénératives associées à la présence de dépôts 5 amyloïdes (maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, etc...).

La maladie d'Alzheimer est un désordre neurodégénératif ou neuroagrégatif qui affecte 1 à 6 % de la population âgée de plus de 65 ans. L'une de ses caractéristiques est la présence de plaques séniles qui contiennent du  $\beta$ -amyloïde, produit toxique dérivé de la protéine  $\beta$ APP ( $\beta$  Amyloid Precursor Protein), constitué 10 de peptides de 39 à 42 acides aminés (peptides A $\beta$ ), engendrés par le clivage de la  $\beta$ APP par des sécrétases. Les mécanismes responsables de la toxicité du  $\beta$ -amyloïde ne sont pas connus et la relation entre le  $\beta$ -amyloïde et la pathologie n'est pas élucidée.

Jusqu'à maintenant, il n'existe pas de traitement de la maladie d'Alzheimer mais l'immunothérapie à base d'anticorps semble être une voie extrêmement prometteuse. En effet, dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (souris transgéniques pour la protéine  $\beta$ APP), il a été montré que l'immunisation par le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (peptide A $\beta$ 42) empêche le dépôt cérébral de  $\beta$ -amyloïde chez les jeunes souris, élimine les dépôts de  $\beta$ -amyloïde chez les souris âgées et surtout prévient les pertes de mémoire chez ces souris (Schenk et al., *Archives of Neurology*, 2000, 57 : 934-936 ; Weiner et al., *Annals of Neurology*, 2000, 48): 567-579 ; Janus et al., *Nature*, 2000, 408 : 979-982 ; Morgan et al., *Nature*, 2000, 408: 982-9857; Bard, F., et al., *Nature Medicine*, 2000. 6: 916-9 ; Solomon et al., *P.N.A.S.*, 1997, 94 : 4109-4112). La Demande Internationale PCT WO 02/074240 préconise également l'immunothérapie passive (administration d'anticorps anti-amyloïdes), dans 20 la mesure où les vaccins à base de peptide A $\beta$ 42 se sont révélés inflammatoires. Les anticorps préconisés sont des immunoglobulines classiques, produites par les techniques d'ADN recombinant ou par synthèse chimique.

Deux mécanismes non-exclusifs ont été proposés pour expliquer l'action des anticorps anti-A $\beta$ 42 :

30. - un effet direct des anticorps à l'intérieur du cerveau (Bard et al., précité; Solomon et al., *DNA & Cell Biology*, 2001, 20 : 697-703) ; les anticorps se

fixeraient au peptide A $\beta$ 42 du cerveau d'une manière qui empêche la conversion de la forme soluble du peptide en la forme insoluble trouvée sur les plaques (Solomon et al., 2001, précité). Cette hypothèse est appuyée par les travaux sur l'immunisation contre la protéine du prion (Peretz et al., *Nature*, 2001, 412: 739-743),

5 - un effet indirect sur les échanges dynamiques du peptide A $\beta$ 42 entre le sang et le cerveau (DeMattos, R.B., et al., *P.N.A.S.*, 2001, 98: 8850-8855) ; les anticorps anti-A $\beta$ 42 ne pénétreraient pas dans le cerveau, mais agiraient plutôt à la périphérie. Le peptide A $\beta$ 42 semble passer la barrière hémato-encéphalique par transport actif et être en situation d'équilibre entre le cerveau et le sang. En se fixant  
10 aux peptides A $\beta$ 42 en solution dans le sang, les anticorps pourraient modifier cet équilibre, causant la séquestration du peptide A $\beta$ 42 dans le sang ou peut-être son extraction du cerveau.

Toutefois, les anticorps monoclonaux de souris ou leurs fragments (scFv) présentent les inconvénients suivants pour une utilisation en thérapie humaine :

15 - les anticorps monoclonaux de souris qui sont immunogènes chez l'Homme ne peuvent pas être administrés de façon répétée, sur une longue période, et  
- les fragments scFv sont peu solubles et peu stables *in vivo*.

Afin de traiter plus efficacement les maladies comprenant le dépôt de substances amyloïdes et notamment les maladies neuroagrégatives telles que la  
20 maladie d'Alzheimer, il existe un réel besoin de disposer de nouveaux anticorps mieux adaptés aux besoins de la pratique.

Par ailleurs, certaines maladies infectieuses sont dues à des espèces bactériennes qui expriment au moins une molécule d'adhésion et notamment de la phosphorylcholine à leur surface et colonisent les muqueuses (pathogènes primaires,  
25 pathogènes occasionnels ou pathogènes commensales). Les infections mucosales sont la première étape d'infections invasives (bactériémies et méningites) : *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Streptococcus pneumoniae*. En raison des polyrésistances aux antibiotiques et de l'absence de vaccins efficaces, notamment en raison de la variabilité de certaines espèces (*N. meningitidis* et *S. pneumoniae*), il  
30 existe un réel besoin de traitements alternatifs de ces infections, ainsi que d'un diagnostic rapide.

Les camélidés (chameaux, dromadaires, lamas, alpagas, etc...) ont la particularité de posséder à la fois des immunoglobulines classiques possédant deux chaînes lourdes et deux chaînes légères et des immunoglobulines dénommées immunoglobulines à chaîne lourde (HCabs) ou immunoglobulines à chaîne unique qui possèdent deux chaînes lourdes mais pas de chaînes légères (Pour une revue voir NGUYEN et al., *Advances in Immunology*, 2001, 79: 261-296 et Muyldermans et al., *Reviews in Molecular Biotechnology*, 2001, 74: 277-302). Leur chaîne lourde qui possède un poids moléculaire compris entre 43 kDa et 47 kDa selon les espèces, est constituée d'un domaine variable (VHH) d'environ 16 kDa, séparé de deux domaines constants (CH2 et CH3) par une région charnière. Leur paratope (domaine de liaison à l'antigène) est constitué d'un seul domaine variable (VHH). Malgré l'absence de diversité due à la combinatoire entre les domaines variables des chaînes lourdes et légères (VH-VL), ces anticorps à chaîne unique possèdent une grande capacité de reconnaissance des antigènes grâce à des CDRs qui possèdent un nombre d'acides aminés plus important que les CDRs « classiques ». La préparation d'anticorps à partir de camélidés immunisés par un antigène (toxine bactérienne ou venin) et le criblage, par la technique d'exposition sur phage (*phage display*), de banques de ces domaines VHH sont décrits dans la Demande EP 0739 981.

Les banques fabriquées à partir de ces domaines VHH uniques contiennent des anticorps fonctionnels qui ont subi une maturation *in vivo*. Les VHH issus de ces banques possèdent une affinité et une spécificité élevées pour l'antigène. En outre, ils sont capables de reconnaître des épitopes peu immunogènes pour les anticorps "classiques" et certains d'entre eux sont des inhibiteurs d'enzyme très puissants grâce à un mécanisme très original ; le CDR 3 qui est beaucoup plus long que la moyenne est capable de former une boucle qui va s'insérer dans le site actif de l'enzyme.

Les VHH, sélectionnés à partir de ces banques, sont bien exprimés, très solubles et très stables. En outre, du fait de leur petite taille et de l'homologie de leurs séquences FR avec celles des immunoglobulines humaines, les VHH sont peu immunogènes chez l'Homme.

En conséquence, les VHH offrent des perspectives incontestables pour le diagnostic et le traitement de pathologies humaines ou animales, par rapport aux anticorps monoclonaux ou aux fragments d'anticorps conventionnels (ScFv).

En outre, pour ce qui concerne les infections dans lesquelles on observe l'expression d'au moins un molécule d'adhésion et notamment de phosphorylcholine à la surface des agents pathogènes, l'administration de tels anticorps, notamment par voie topique (intranasale, dans le cas des agents pathogènes respiratoires) présentent les avantages supplémentaires suivants :

- efficacité jusqu'à cent fois supérieure à celle de l'administration parentérale
  - activité immédiate
  - traitement ciblé au site même de l'infection
  - facilité d'administration et bonne tolérance
  - peu ou pas d'interférence avec le système immunitaire de l'hôte
  - adaptation rapide de la préparation d'anticorps à tout nouveau variant antigénique
    - peu de risque de sélection de variants résistants.

En conséquence, la présente invention a pour objet l'utilisation d'anticorps à chaîne unique de camélidés, sélectionnés dans le groupe constitué par des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes ne secrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV et des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, pour la détection de la présence d'un agent pathogène ne secrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV ou pour la détection d'une maladie comprenant des dépôts de substances amyloïdes insolubles.

Les Inventeurs ont préparé une banque de fragments variables d'anticorps de camélidés, dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (banque VHH-A $\beta$ 42) ; à partir de cette banque, les Inventeurs ont isolé des fragments d'anticorps qui répondent mieux aux besoins de la pratique en ce qu'ils présentent les propriétés suivantes :

- ils se lient spécifiquement au peptide 1-42 du précurseur de la protéine  $\beta$ -amyloïde avec une affinité élevée,
- ils possèdent un faible poids moléculaire et sont solubles,
- ils sont très stables, et

5            - ils sont peu immunogènes.

Les fragments variables d'anticorps à chaîne unique anti- $A\beta$ 42 représentent des candidats pour une immunothérapie des maladies comprenant le dépôt de substances amyloïdes dans au moins un organe ou tissu et notamment de la maladie d'Alzheimer. En outre, ils sont utiles pour le diagnostic de cette maladie ; par  
10          exemple des VHH marqués peuvent être utilisés en imagerie médicale.

En conséquence, la présente invention a pour objet une banque immune d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 (SEQ ID NO: 1), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724  
15          Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2937.

La banque immune d'ADNc VHH- $A\beta$ 42 selon l'invention est préparée à partir de lymphocytes de camélidés immunisés par le peptide  $A\beta$ 42, par clonage de fragments VHH, comme décrit dans la Demande EP 0739981.

La présente invention a également pour objet un fragment variable  
20          d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, caractérisé en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture de la banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps VHH- $A\beta$ 42 telle que définie ci-dessus, dans des conditions permettant l'expression  
25          desdits fragments variables,
- la mise en contact desdits fragments variables avec le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42 ( $A\beta$ 42), dans des conditions permettant la liaison dudit fragment variable d'anticorps avec ledit peptide, et
- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables  
30          d'anticorps capables de se lier audit peptide.

Les conditions de culture de la banque d'ADNc et d'incubation des fragments variables avec le peptide A $\beta$ 42 sont des conditions classiques connues en elles-mêmes de l'Homme du métier.

Conformément à l'invention, lesdits fragments variables d'anticorps à chaîne unique sont issus de n'importe quel animal de la famille des camélidés, par exemple de chameau, dromadaire, lama ou d'alpaga.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit fragment variable d'anticorps, il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9.

La présente invention a également pour objet un anticorps ou un fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini ci-dessus.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite molécule d'ADNc, elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 2, 4, 6 et 8.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule d'ADNc telle que définie ci-dessus.

De nombreux vecteurs où l'on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple réPLICATION de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomal de l'hôte), ainsi que de la nature de la cellule hôte.

De préférence, ledit vecteur est un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote, comprenant au moins une cassette d'expression comprenant l'ADNc codant les fragments variables d'anticorps (VHH-A $\beta$ 42) tels que définis ci-dessus, placé sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié, notamment un promoteur permettant l'expression desdits fragments VHH-A $\beta$ 42 dans des cellules

hôtes modifiées. Avantageusement, ledit ADNc est cloné dans ledit vecteur, en phase avec une séquence étiquette, éventuellement clivable (épitope, séquence polyHistidine...) ; une telle construction permet de produire ledit fragment VHH-A $\beta$ 42 sous forme d'une protéine de fusion qui est ensuite purifiée sur une colonne appropriée 5 (colonne d'immunoaffinité ou colonne de nickel), ladite séquence étiquette pouvant éventuellement être clivée par tout moyen approprié.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique ou un vecteur tels que définis ci-dessus.

10 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2933 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH-A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO: 3.

15 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2934 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH-A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO: 5.

20 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2935 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH-A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO: 7.

25 Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite cellule hôte modifiée, elle a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2936 ; ladite cellule hôte exprime le fragment VHH- A $\beta$ 42 de séquence SEQ ID NO:9.

30 Les molécules d'acide nucléique selon l'invention sont obtenues par les méthodes classiques, connues en elles-mêmes, en suivant les protocoles standards tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M.

*AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).* Par exemple, elles peuvent être obtenues par amplification d'une séquence nucléique par PCR ou RT-PCR ou bien par synthèse chimique totale ou partielle.

Les techniques de production et de purification de protéines recombinantes, les méthodes d'immunisation et de production d'anticorps et les techniques immunologiques reposant sur la détection de complexes antigène-anticorps (ELISA, RIA, Western-Blot) sont connues en elles-mêmes ; à titre d'exemple on peut citer celles décrites dans *Current Protocols in Molecular Biology*, précité et dans *Current protocols in Immunology* (John E. Coligan, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA).

Du fait de leurs propriétés telles que définies ci-dessus, les fragments variables d'anticorps (VHH-A $\beta$ 42) selon l'invention sont utiles pour le diagnostic et le traitement des maladies comprenant un dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes, et notamment des maladies neuroagrégatives comme la maladie d'Alzheimer.

En conséquence la présente invention a pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 ou bien d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps dérivés, tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection de maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes insolubles, et notamment des maladies neuroagrégatives comme la maladie d'Alzheimer.

Ladite détection peut-être effectuée par toute technique appropriée, notamment par des techniques d'imagerie médicale.

La présente invention a également pour objet un kit de diagnostic de maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes insolubles, et notamment des maladies neuroagrégatives comme la maladie d'Alzheimer, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a en outre pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-A $\beta$ 42 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant

ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention a également pour objet l'utilisation des anticorps VHH-A $\beta$ 42 tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, lesdites maladies sont des maladies neuroagrégatives, notamment la maladie d'Alzheimer.

10 Du fait de leurs propriétés telles que définies ci-dessus, les fragments variables d'anticorps (VHH-A $\beta$ 42) selon l'invention présentent les avantages suivants par rapport aux anticorps ou fragments d'anticorps existants :

- ils sont produits facilement, en grande quantité, à un coût peu élevé,
- 15 - ils se lient au peptide A $\beta$ 42 de façon spécifique et avec une affinité élevée,
- ils possèdent une demi-vie importante,
- ils n'induisent pas de réponse immunitaire du type HAMA (Human anti-mouse antibody) et peuvent donc être administrés chez un patient humain ou
- 20 animal, de façon répétée sur une longue durée.

Par ailleurs, les fragments variables d'anticorps à chaîne unique anti-molécules d'adhésion et plus particulièrement anti-phosphorylcholine représentent des candidats pour une immunothérapie des maladies infectieuses telles que définies ci-dessus, i.e. dues à des agents pathogènes exprimant à leurs surfaces au moins une molécule d'adhésion et notamment la phosphorylcholine ; les maladies concernées 25 sont notamment les maladies infectieuses mucosales des voies respiratoires.

En conséquence, la présente invention a également pour objet un fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre des agents pathogènes ne secrétant pas de toxines, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de mammifères et en ce

qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces des molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,
- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une molécule d'adhésion ou des agents pathogènes exprimant à leur surface des molécules d'adhésion, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une desdites molécules d'adhésion, et
- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-molécule d'adhésion capables de se lier à la molécule d'adhésion correspondante.

La molécule d'adhésion est de préférence la phosphorylcholine ; dans ce cas, la présente invention a également pour objet un fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre des agents pathogènes, à l'exclusion des bactéries produisant des toxines et à l'exclusion des toxines correspondantes, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de mammifères et en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces de la phosphorylcholine (VHH-anti-phosphorylcholine), dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,
- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec de la phosphorylcholine ou des agents pathogènes exprimant à leur surface de la phosphorylcholine, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments variables d'anticorps avec la phosphorylcholine, et
- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine, capables de se lier à la phosphorylcholine.

On entend, au sens de la présente invention, par anticorps VHH-anti-phosphorylcholine :

- des anticorps dirigés contre des agents pathogènes présentant à leur surface de la phosphorylcholine, ou dirigés contre la phosphorylcholine,
- 5 - lesdits anticorps reconnaissant la phosphorylcholine dans n'importe quel environnement.

Les conditions de culture de la banque d'ADNc et d'incubation des fragments variables avec la phosphorylcholine sont des conditions classiques connues en elles-mêmes de l'Homme du métier.

10 Conformément à l'invention, lesdits fragments variables d'anticorps à chaîne unique (VHH-anti-molécules d'adhésion ou VHH-anti-phosphorylcholine) sont issus de n'importe quel animal de la famille des camélidés, par exemple de chameau, dromadaire, lama ou d'alpaga.

15 Selon un mode de réalisation avantageux dudit fragment variable d'anticorps (VHH-anti-phosphorylcholine), il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO :29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 et 49.

20 La banque immune d'ADNc VHH-anti-molécules d'adhésion ou VHH-anti-phosphorylcholine selon l'invention est préparée à partir de lymphocytes de camélidés immunisés soit par des agents pathogènes présentant à leur surface de la phosphorylcholine, soit par de la phosphorylcholine éventuellement couplée à une protéine porteuse telle que la KLH ou la sérum albumine, par clonage de fragments VHH, comme décrit dans la Demande Européenne n° 0 739 981.

25 La présente invention a également pour objet un anticorps ou un fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable VHH-anti-molécule d'adhésion et notamment VHH-anti-phosphorylcholine, tel que défini ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini ci-dessus.

30 Selon un mode de réalisation avantageux de ladite molécule d'ADNc, elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 et 48.

La présente invention a également pour objet un vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule d'ADNc telle que définie ci-dessus.

De nombreux vecteurs où l'on peut insérer une molécule d'acide nucléique d'intérêt afin de l'introduire et de la maintenir dans une cellule hôte eucaryote ou procaryote, sont connus en eux-mêmes ; le choix d'un vecteur approprié dépend de l'utilisation envisagée pour ce vecteur (par exemple réPLICATION de la séquence d'intérêt, expression de cette séquence, maintien de la séquence sous forme extrachromosomique ou bien intégration dans le matériel chromosomique de l'hôte),  
ainsi que de la nature de la cellule hôte.

De préférence, ledit vecteur est un vecteur d'expression procaryote ou eucaryote, comprenant au moins une cassette d'expression comprenant l'ADNc codant les fragments variables d'anticorps (VHH-anti-phosphorylcholine) tels que définis ci-dessus, placé sous le contrôle transcriptionnel d'un promoteur approprié,  
notamment un promoteur permettant l'expression desdits fragments VHH-anti-phosphorylcholine dans des cellules hôtes modifiées. Avantageusement, ledit ADNc est cloné dans ledit vecteur, en phase avec une séquence étiquette, éventuellement clivable (épitope, séquence polyHistidine...) ; une telle construction permet de produire ledit fragment VHH-anti-phosphorylcholine sous forme d'une protéine de fusion qui est ensuite purifiée sur une colonne appropriée (colonne d'immunoaffinité ou colonne de nickel), ladite séquence étiquette pouvant éventuellement être clivée par tout moyen approprié.

La présente invention a également pour objet une cellule hôte eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique ou un vecteur tels que définis ci-dessus.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une molécule d'adhésion à leur surface.

Dans le cas où la molécule d'adhésion est la phosphorylcholine, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-

anti-phosphorylcholine ou bien d'un anticorps ou d'un fragment d'anticorps dérivés, tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface et notamment des maladies infectieuses des voies 5 respiratoires.

Ladite détection peut-être effectuée par toute technique appropriée, notamment par des techniques d'imagerie médicale.

La présente invention a également pour objet un kit de diagnostic des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la 10 phosphorylcholine à leur surface et notamment des maladies infectieuses des voies respiratoires, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus.

La présente invention a en outre pour objet une composition 15 pharmaceutique comprenant des anticorps de camélidés dirigés contre des agents pathogènes ou leurs fragments, caractérisée en ce qu'ils ne秘rètent pas de toxine et en ce qu'ils ne sont pas des éléments constitutifs de la protéase NS3 de HCV.

La présente invention a également pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable 20 d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne selon l'invention.

Dans le cas où la molécule d'adhésion est la phosphorylcholine, la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphoryl- 25 choline ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps, tels que définis ci-dessus, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

Conformément à l'invention ladite composition est avantageusement associée à des véhicules pharmaceutiquement acceptables appropriés à une 30 administration intranasale.

La présente invention a également pour objet l'utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la

paroi bactérienne, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une molécule d'adhésion à leur surface.

Dans le cas où la molécule d'adhésion est la phosphorylcholine, la 5 présente invention a également pour objet l'utilisation des anticorps VHH-anti-phosphorylcholine tels que définis ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite utilisation, 10 lesdites maladies sont des maladies infectieuses qui colonisent les muqueuses et plus particulièrement des maladies infectieuses des voies respiratoires.

Outre les dispositions qui précédent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre de la banque de VHH anti- $\beta$ 42 selon l'invention, ainsi 15 qu'au Tableau I illustrant les séquences de la Demande et aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre la cinétique en ELISA, des anticorps sériques spécifiques chez les alpagas immunisés avec le peptide A $\beta$ 42. Les valeurs représentent la densité optique à 295 nm des sérums dilués au 1/3200, respectivement 20 aux jours J<sub>0</sub>, J<sub>35</sub>, J<sub>77</sub> et J<sub>131</sub> du protocole d'immunisation.

- la figure 2 illustre la diversité de la banque de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, spécifiques du peptide A $\beta$ 42 (VHH anti-A $\beta$ 42), analysée sur 6 clones (VHH-03, VHH-05, VHH-07, VHH-25, VHH-11 et VHH-33, respectivement SEQ ID NO : 26, 24, 22, 23, 25 et 27) pris au hasard.

25 - la figure 3 illustre la séquence en acides aminés des VHHs des clones VHH ALZ-61, VHH ALZ-L35, VHH ALZ L1-3, VHH ALZ V31-1 (SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9). Les séquences indiquées en gras correspondent respectivement au CDR1, CDR2 et CDR3.

- la figure 4 illustre la liaison des VHHs solubles des clones VHH 30 ALZ-61, VHH ALZ-L35, VHH ALZ L1-3, VHH ALZ V31-1 au peptide A $\beta$ 42, analysée par un test ELISA direct.

- la figure 5 illustre la formule GPB-synthon utilisée pour le criblage des banques : PC liée à N-acétyl glucosamine (GalNac) couplée à la biotine via un pont disulfure.
- la figure 6 illustre les séquences nucléotidiques des VHH anti-phosphorylcholine sélectionnés.

**Tableau I: Séquences de la Demande**

Numéro d'identification	Séquence
SEQ ID NO: 1	peptide A $\beta$ 42
SEQ ID NO: 2	ADNc VHH-61
SEQ ID NO: 3	peptide VHH-61
SEQ ID NO: 4	ADNc VHH-L35
SEQ ID NO: 5	peptide VHH-L35
SEQ ID NO: 6	ADNc VHH-L1-3
SEQ ID NO: 7	peptide VHH-L1-3
SEQ ID NO: 8	ADNc VHH-V31-1
SEQ ID NO: 9	peptide VHH-V31-1
SEQ ID NO: 10	amorce VBACK A6
SEQ ID NO: 11	amorce CH2FORT A4
SEQ ID NO: 12	amorce VBACKA4
SEQ ID NO: 13	amorce VFHFOR36
SEQ ID NO: 14	amorce LH
SEQ ID NO: 15	ADNc VHH-07
SEQ ID NO: 16	ADNc VHH-25
SEQ ID NO: 17	ADNc VHH-05
SEQ ID NO: 18	ADNc VHH-11
SEQ ID NO: 19	ADNc VHH-17
SEQ ID NO: 20	ADNc VHH-03
SEQ ID NO: 21	ADNc VHH-43
SEQ ID NO: 22	peptide VHH-07
SEQ ID NO: 23	peptide VHH-25
SEQ ID NO: 24	peptide VHH-05

SEQ ID NO: 25	peptide VHH-11
SEQ ID NO: 26	peptide VHH-03
SEQ ID NO: 27	peptide VHH-33
SEQ ID NO:28	ADNc clone 1
SEQ ID NO:29	peptide clone 1
SEQ ID NO:30	ADNc clone 2
SEQ ID NO:31	peptide clone 2
SEQ ID NO:32	ADNc clone 3
SEQ ID NO:33	peptide clone 3
SEQ ID NO:34	ADNc clone 4
SEQ ID NO:35	peptide clone 4
SEQ ID NO:36	ADNc clone 5
SEQ ID NO:37	peptide clone 5
SEQ ID NO:38	ADNc clone 7
SEQ ID NO: 39	peptide clone 7
SEQ ID NO:40	ADNc clone 8
SEQ ID NO:41	peptide clone 8
SEQ ID NO:42	ADNc clone 9
SEQ ID NO:43	peptide clone 9
SEQ ID NO:44	ADNc clone 10
SEQ ID NO :45	peptide clone 10
SEQ ID NO:46	ADNc clone 11
SEQ ID NO:47	peptide clone 11
SEQ ID NO:48	ADNc clone 12
SEQ ID NO:49	peptide clone 12
SEQ ID NO:50	Amorce M13-40
SEQ ID NO:51	Amorce myc seq 10

**Exemple 1 : Préparation d'une banque de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, spécifiques du peptide A $\beta$ 42 (VHH anti- A $\beta$ 42)**

**1) Immunisation d'alpagas avec le peptide A $\beta$ 42**

Le peptide A $\beta$ 42 (SEQ ID NO: 1) est synthétisé en phase solide  
5 selon la méthode décrite par Merrifield et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 1964, **85** : 2149).

Un alpaga (*Lama pacos*) a été immunisé avec le peptide A $\beta$ 42 agrégé (ce peptide a tendance naturellement à s'agréger et à former des fibres amyloïdes) en suivant le protocole suivant :

***J<sub>0</sub>: Saignée pré-immune***

10 - J<sub>0</sub>: 200 µg de peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant complet de Freund par voie sous-cutanée  
- J<sub>10</sub>: 200 µg peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée  
- J<sub>21</sub>: 200 µg peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par

15 voie sous-cutanée

***J<sub>35</sub>: saignée 2***

- J<sub>42</sub>: 200 µg peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée  
- J<sub>48</sub>: 200 µg peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par  
20 voie sous-cutanée

- J<sub>70</sub>: 200 µg peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée

***J<sub>77</sub> : saignée 3***

- J<sub>101</sub> : **prélèvement des lymphocytes**  
25 - J<sub>101</sub> : 200 µg peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée  
- J<sub>115</sub> : 200 µg peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par voie sous-cutanée  
- J<sub>129</sub> : 200 µg peptide A $\beta$ 42 en Adjuvant incomplet de Freund par  
30 voie sous-cutanée

**J<sub>131</sub> : saignée 4**

La cinétique de la réponse en anticorps sériques spécifiques du peptide A $\beta$ 42 est analysée, en ELISA, aux jours J<sub>0</sub>, J<sub>35</sub>, J<sub>77</sub> et J<sub>131</sub>, sur des peptides à la dilution 1/3200.

5 Les résultats présentés à la figure 1 montrent un pic d'anticorps à J<sub>77</sub>.

**2) Purification des ARNm et synthèse des ADNc**

Les lymphocytes sanguins sont préparés à partir du sang hépariné prélevé à J<sub>131</sub>, par centrifugation en gradient de ficoll. De manière plus précise, le sang 10 (120 ml) hépariné (25 000 UI d'héparine) est dilué dans du tampon HBSS (120 ml), centrifugé sur un gradient de ficoll, pendant 30 min à 400 g, puis les lymphocytes sont récoltés, lavés trois fois dans du tampon HBSS, centrifugés pendant 5 min à 1000 g. Les lymphocytes ainsi obtenus ( $1,7 \cdot 10^8$  cellules) sont aliquotés ( $3 \cdot 10^7$  cellules par tube) puis les ARNm sont extraits à partir de  $10^7$  lymphocytes, à l'aide du kit 15 RNAXEL® (Eurobio), en suivant les instructions du fabricant.

L'ADNc est synthétisé à partir de 5 à 10  $\mu$ g d'ARNm dans les conditions suivantes : 2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoéthanol (1M) et 2  $\mu$ l de RNAsine 40 U/ $\mu$ l (PROMEGA) sont ajoutés à 20  $\mu$ l de la préparation d'ARNm purifié et le mélange est incubé 5 min à température ambiante, puis 2 heures à 42 °C, dans un volume de 96  $\mu$ l 20 contenant 400 UI de MLV (GIBCO) dans du tampon MLV(GIBCO) 8,33 mM DTT, 500  $\mu$ M de chacun des dNTPs et 6 à 30 pmoles d'amorce hexanucléotidique aléatoire (PdN6).

Les fragments VHH sont amplifiés par des réactions de PCR imbriquées (*nested PCR*) :

25 - 1<sup>ère</sup> réaction PCR

Un produit de 600 pb correspondant au fragment VHH-charnière-CH2 est amplifié à l'aide du couple d'amorces :

- VHBACK A6 :5' GATGTGCAGCTGCAGCGTCTGGRGAGG 3' (SEQ ID NO: 10)
- CH2FORT A4 :5' CGCCATCAAGGTACCAGTTGA 3' (SEQ ID NO: 11)

30 De manière plus précise, la réaction PCR est réalisée dans un volume final de 50  $\mu$ l, en présence de 5  $\mu$ l d'ADNc, 6 à 30 pmoles de chacune des

amorces, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chacun des dNTPs et 5 unités de Taq polymérase Hot start (QIAGEN).

L'amplification PCR est réalisée dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 15 min est suivie de 40 cycles alternant 5 une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation des amorces à 52°C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 30 sec, puis la réaction est terminée par une étape finale d'extension à 72 °C pendant 2 min.

Le produit d'amplification de 600 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-10 Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL).

- **2<sup>ème</sup> réaction PCR :**

Un produit d'environ 350 pb correspondant au fragment VHH est amplifié à partir du produit de 600 pb, à l'aide des couples d'amorces suivants :

.15 \* **Couple 1 :**

- VHBACKA4 (*SfiI*): 5' CATGCCATGACTCGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGAKGTSCA GCT 3' (SEQ ID NO: 12)

et

- VHFOR36 (*NotI*): 5' GGACTAGTTGCGGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTG 3' (SEQ 20 ID NO: 13).

\* **Couple 2 :**

- VHBACKA4 (*SfiI*)

et

- LH (*NotI*): 5' GG ACT AGT TGC GGC CGC TGG TTG TGG TTT TGG TGT CTT GGG 3'

25 (SEQ ID NO: 14)

Le couple 1 amplifie les VHH de tous les isotypes d'immuno-globulines à chaîne unique alors que le couple 2 est spécifique de l'isotype IgG3.

De manière plus précise, la réaction PCR est réalisée dans un volume final de 50 µl, en présence de 5 µl du produit de 600 pb, 10 pmoles de 30 chacune des amorces, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de chacun des dNTPs et 5 unités de Taq polymérase.

L'amplification PCR est réalisée dans les conditions suivantes : une étape initiale de dénaturation à 95°C pendant 15 min est suivie de 35 cycles alternant une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 sec, une étape d'hybridation des amorces à 45°C pendant 30 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 60 sec, puis la réaction 5 est terminée par une étape finale d'extension à 72°C pendant 2 min.

Le produit d'amplification de 350 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL).

#### 10 3) Clonage des ADNc dans le vecteur pHEN 1

Le phagemide pHEN1 (Hoogenbaum et al., *N.A.R.*, 1991, **19**: 4133-4137) est purifié à l'aide du kit Nucleobond AX (MACHEREY/NAGEL), digéré par les enzymes *Sfi* I et *Not* I (BIOLABS), en suivant les instruction du fabricant, purifié sur gel d'agarose comme décrit ci-dessus, puis traité à la phosphatase alcaline (CIP). 15 Le phagemide pHEN1 linéarisé et déphosphorylé et le produit d'amplification de 350 pb préalablement digéré par les enzymes *Sfi* I et *Not* I, sont ensuite incubés en présence de ligase, puis des bactéries *E.coli* SURE® sont transformées par électroporation avec le produit de la ligation. Les bactéries transformées sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu 2YT gélosé, additionné de 100 µg/ml d'ampicilline 20 et de 1 % de glucose. Les colonies résistantes ( $2 \times 10^6$  clones) sont remises en suspension dans du milieu 2YT et la banque est conservée à -80°C dans du glycérol.

La banque ainsi obtenue qui contient des clones incluant un insert VHH amplifié avec le couple d'amorces 1 (sous-banque 1) et des clones incluant un insert VHH amplifié avec le couple d'amorces 2 (sous-banque 2 spécifique de l'isotype 25 IgG3), est dénommée banque immune VHH ALZ, a été déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2937.

#### 4) Contrôle de la diversité de la banque

30 L'ADN plasmidique de 12 colonies résistantes est extrait à l'aide du kit Nucleospin Plasmid (MACHEREY/NAGEL).

La présence d'un insert est contrôlée par restriction enzymatique de l'ADN plasmidique, à l'aide de *Sfi I* et *Not I* (BIOLABS), en suivant les instructions du fabricant.

La diversité de la banque est contrôlée par amplification de l'ADN 5 plasmidique, par PCR à l'aide du couple d'amorces VHBACKA4 et VHFOR36 comme décrit ci-dessus puis restriction enzymatique du produit PCR, à l'aide de *Bst NI* (BIOLABS), en suivant les instructions du fabricant et séparation des produits de digestion par électrophorèse en gel d'agarose (3 %). Alternativement, la séquence des inserts est déterminée par séquençage automatique.

10 Les résultats sont les suivants :

- 90 % des clones ont un insert (VHH-07, VHH-25, VHH-05, VHH-11, VHH-17, VHH-03, VHH-43, VHH-61, VHH-L35, VHH-L1-3, VHH-V31-1 et VHH-33, respectivement SEQ ID NO: 15 à 21, 2, 4, 6 et 8).

- le profil de restriction par *Bst NI* montre une diversité des inserts.

15 La figure 2 montre que la banque possède une grande diversité étant donné que parmi 6 clones pris au hasard, 5 codent pour des VHH dont les CDRs sont tous différents entre eux (VHH-05, VHH-07, VHH-25, VHH-11 et VHH-33, respectivement SEQ ID NO: 24, 22, 23, 25 et 27) et 1 code pour un VH tronqué sans CDR3 (VHH-03, SEQ ID NO: 26).

20 **Exemple 2 : Criblage de la banque de VHH anti-A $\beta$ 42 par la technique d'exposition sur phage**

### 1) Matériels et méthodes

Les phagémides de la banque de VHH anti-A $\beta$ 42 sont encapsidés dans des phages filamenteux (M13) et les phages sont amplifiés et titrés selon les 25 techniques classiques de Biologie moléculaire en suivant les protocoles standard tels que ceux décrits dans *Current Protocols in Molecular Biology* (Frederick M. AUSUBEL, 2000, Wiley and son Inc, Library of Congress, USA). 3 criblages successifs de la banque de VHH anti-A $\beta$ 42 ont été réalisés par la technique d'exposition sur phage, en suivant le protocole suivant :

30 - 1<sup>er</sup> criblage

4 ml de peptide A $\beta$ 42 (25  $\mu$ g/ml) dilué dans du tampon PBS sont répartis dans des immunotubes (maxisorp®, 5 ml, NUNC) puis incubés une nuit à

37°C ou à 4°C. Après 5 lavages dans du PBS , 4 ml de tampon PBS contenant 2 % de lait écrémé (tampon de saturation) sont ajoutés et incubés 2 h à 37°C. Après des lavages avec du tampon PBS, 10<sup>12</sup> à 10<sup>13</sup> phages dilués dans 4 ml de tampon PBS contenant 2 % de lait écrémé sont ajoutés et incubés une heure à température ambiante sur une roue, puis une heure à température ambiante sans agitation. Après 10 lavages avec du tampon PBS contenant 0,1 % de Tween 20 suivis de 10 lavages avec du tampon PBS, 3 ml d'une culture d'*E. coli* TG1 (*supE hsdΔ5thi Δ(lac-proAB)* F' [*traD36 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ DM15*], STRATAGENE), à la densité optique de 0,5, sont ajoutés dans les immunotubes et incubés 45 min à 37°C, sous agitation. A la fin de l'incubation, les bactéries sont diluées (dilutions 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup> et 10<sup>-6</sup>) dans un volume de 100 µl, étalées sur des boîtes de Pétri contenant du milieu 2YTAG gélosé (milieu 2YT additionné de 100 µg/ml d'ampicilline et de 1 % de glucose) et incubées une nuit à 37°C. Le reste de la culture (3 ml) est étalé sur une grande boîte de Pétri contenant le même milieu et incubé une nuit à 30°C.

15 - 2<sup>ième</sup> et 3<sup>ième</sup> criblages

Le lendemain, les bactéries survivantes sont récoltées dans 5 ml de milieu 2YT puis 50 µl sont mis en culture dans 100 ml de milieu 2YTAG et le volume restant est congelée à -80°C dans du glycérol. La culture est incubée à 37°C jusqu'à l'obtention d'une DO<sub>600</sub> de 0,5 puis 10 ml de la culture sont infectés par 0,5 ml de phage auxiliaire (*helper* phage), incubés 130 min à 37° C sans agitation puis centrifugés 10 min à 5000 rpm. Le culot est remis en suspension dans 50 ml de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100 µg/ml) et de kanamycine (25 µg/ml) et la suspension obtenue est incubée une nuit à 30°C. Ensuite, 40 ml de cette culture sont centrifugés 10 min à 8000 rpm et le surnageant additionné de 8 ml d'une solution de PEG/NaCl (20 % PEG 8000, 2,5 M NaCl) est incubé 2 à 4 h à 4°C puis centrifugé 2 fois à 10 min à 8000 rpm. Le culot de phage est remis en suspension dans 2 ml de PBS puis les phages sont titrés comme décrit ci-dessus et 1 ml de phage est criblé sur immunotube, comme décrit pour le 1<sup>er</sup> criblage, à l'exception que la concentration de peptide déposée dans les immunotubes est diminuée et la composition des tampons de saturation et de lavage des phages non fixés sont modifiés comme indiqué dans le Tableau II ci-dessous :

**Tableau II : Conditions des criblages successifs**

Criblage	Concentration en peptide	Tampon de saturation	Tampon de lavage
1 <sup>er</sup> criblage	25 µg/ml	PBS + 2 % de poudre de lait écrémé	PBS + 0,1 % Tween 20
2 <sup>ième</sup> criblage	12,5 µg/ml	PBS + 0,5 % gélatine	PBS + 0,3 % Tween 20
3 <sup>ième</sup> criblage	12,5 µg/ml	PBS + 3 % BSA	PBS + 0,5% Tween 20

**3) Résultats**

Le rendement de chaque criblage, représenté par la proportion de phages liés au peptide A $\beta$ 42 est illustré par le Tableau III ci-dessous.

5

**Tableau III : Rendement des criblages**

Criblage	Nbre total de phages	Nbre de phages liés au peptide A $\beta$ 42	Rapport
1 <sup>er</sup> criblage	$2 \times 10^{12}$	$10^9$	$5 \times 10^{-4}$
2 <sup>ième</sup> criblage	$3 \times 10^{13}$	$2 \times 10^{10}$	$6 \times 10^{-4}$
3 <sup>ième</sup> criblage	$10^{14}$	$3,5 \times 10^{13}$	$3 \times 10^{-1}$

La proportion de phages se liant au peptide A $\beta$ 42, en ELISA, est illustrée par le Tableau IV ci-dessous :

**Tableau IV : Proportion de phages se liant au peptide A $\beta$ 42 en ELISA**

Etat de la banque	Sous-banque 1		Sous-banque 2	
	DO < 0,5	DO > 0,5	DO > 0,5	DO > 0,5
Avant criblage	3/8	0/8	3/8	0/8
Après 1 <sup>er</sup> criblage	3/24	3/24	5/24	0/24
Après 2 <sup>ième</sup> criblage	11/32	2/32	5/35	4/32
Après 3 <sup>ième</sup> criblage	15/64	16/64	27/64	1/64

10

Le Tableau IV indique que la proportion de phages se liant avec une bonne affinité au peptide A $\beta$ 42 augmente au cours des criblages successifs.

**Exemple 3 : Production de VHH solubles et analyse de la spécificité et de l'affinité des VHH solubles pour le peptide A $\beta$ 42**

**1) Matériels et méthodes**

**a) Production de VHH solubles**

5 - microculture en plaque à 96 puits

Une colonie de *E. coli* HB2151 (Carter et al., *N.A.R.*, 1991, 19: 4133-4137) contenant le plasmide pHEN-VHH est mise en culture toute la nuit dans un puits d'une microplaqué de 96 puits contenant 200  $\mu$ l de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et de glucose 1% (culture I).

10 3  $\mu$ l de la culture I sont ensuite transférés dans un puits d'une microplaqué de 96 puits contenant 200  $\mu$ l de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et de glucose 0,1% et la culture est incubée pendant 3 heures à 37°C (culture II).

A la fin de cette incubation, 25  $\mu$ l de milieu 2YT contenant de 15 l'IPTG 20 mM (soit 2 mM final) sont ajoutés dans les puits et la culture II est ensuite incubée toute la nuit à 30°C avec agitation. Le lendemain, la culture en plaque est centrifugée 10 min à 2500 rpm et le surnageant contenant les VHH solubles est récolté.

- culture à moyenne échelle

Une colonie de *E. coli* HB2151 (Carter et al., précédent) contenant le 20 plasmide pHEN-VHH est mise en culture dans 75 ml de milieu 2YT additionné d'ampicilline (100  $\mu$ g/ml) et de glucose 1% pendant 2 heures puis la culture est induite par l'IPTG (2mM final) pendant 4 h à 25 °C et centrifugée pendant 10 min à 4000 rpm. Le culot est ensuite remis en suspension dans 1 ml de tampon 200 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA, 17,2 % sucrose (P/V) puis la suspension est incubée 30 25 30 min à 1 h sur de la glace, sous agitation, centrifugée à 13000 rpm; à 4°C, pendant 5 min et le surnageant (périplasme) contenant les VHH solubles est récolté.

**b) Test ELISA (cultures en microplaques)**

Le peptide A $\beta$ 42, dilué dans du tampon PBS (1  $\mu$ g/ml -100  $\mu$ l/puits), est distribué dans les puits d'une microplaqué et la plaque est incubée une 30 nuit à 37°C. Des plaques recouvertes de BSA (1  $\mu$ g/ml -100  $\mu$ l/puits) sont utilisées comme contrôle. Après des lavages avec du tampon PBS contenant 0,1 % Tween 20 (PBS-T), 50  $\mu$ l du surnageant de culture II obtenu comme décrit ci-dessus, mélangé à

50 µl de tampon PBS-T contenant 0,5 % gélatine sont ajoutées dans chaque puits et la plaque est incubée pendant 2 heures à 37°C. Après des lavages dans le même tampon que précédemment, l'anticorps murin anti-*c myc* 9E10 (référence sc-40, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) dilué dans du tampon PBS-T (1 µg/ml – 100 µl par puits) est ajouté dans les puits et la plaque est incubée pendant 1 heure à 37°C. Après des lavages dans le même tampon que précédemment, un anticorps anti-immuno-globulines de souris couplé à la peroxydase diluée dans du tampon PBS-T (1 µg/ml - 100 µl par puits ) est ajouté dans les puits et la plaque est incubée pendant 1 heure à 37°C. La réaction est révélée par addition d'*O*-phénylénediamine (0,2 % dans du tampon citrate 0.1 M, pH 5.2 contenant 0.03 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-100 µl /puits) et incubation des plaques à température ambiante, à l'obscurité. La réaction est ensuite stoppée par addition d'HCl 3 M (50 µl /puits) et l'absorbance à 492 nm est mesurée à l'aide d'un lecteur automatique. Les valeurs significatives correspondent à un rapport DO (A β42)/DO (BSA) supérieur à 5.

15 c) Test ELISA en compétition

Des quantités variables du peptide Aβ42 dans du tampon PBS sont incubés avec une concentration fixe de surnageant de culture contenant le VHH, pendant 2 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite transféré dans les puits d'une microplaqué recouverte de peptide Aβ42, dans les conditions 20 telles que décrites ci-dessus puis la plaque est incubée pendant 30 min à température ambiante et lavée avec du tampon PBS-T et les VHHS libres (VHHS non liés au peptide Aβ42), présents dans le mélange réactionnel sont dosés en ELISA, selon le protocole tel que décrit ci-dessus. Pour chaque concentration , le pourcentage 25 d'inhibition correspond à la valeur  $\frac{I_0 - I_c}{I_0} \times 100$  où I<sub>0</sub> et I<sub>c</sub> sont les absorbances à 492 nm obtenues respectivement, en l'absence et en présence du peptide Aβ42 dans le milieu réactionnel.

**2) Résultats**

Des VHHS solubles ont été préparés selon le protocole tel que décrit 30 ci-dessus, à partir de 4 clones positifs en ELISA, à savoir :

- VHH ALZ 61 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VH-61 (SEQ ID NO: 2) insérée entre

les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-61), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2933.

- VHH ALZ L35 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide 5 pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VHH-L35 (SEQ ID NO: 4) insérée entre les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-L35), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2934.

- VHH ALZ L1-3 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide 10 pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VH-L1-3 (SEQ ID NO: 6) insérée entre les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-L1-3), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2935.

- VHH ALZ V31-1 : *E. coli* HB2151 transformée par le plasmide 15 pHEN-1 qui possède la séquence nucléotidique VHH-V31-1 (SEQ ID NO: 8) insérée entre les sites *Sfi I* et *Not I* (pHEN-1/VHH-V31-1), déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2936.

La séquence en acides aminés des VHH de ces clones (SEQ ID NO: 20 3, 5, 7 et 9) est illustrée par la figure 3.

La spécificité et l'affinité du VHH produit par ces clones pour le peptide A $\beta$ 42 ont été analysées, respectivement en ELISA direct et par un test ELISA en compétition. Les résultats sont les suivants :

- les clones produisent un VHH qui se lie spécifiquement au peptide 25 A $\beta$ 42 (figure 4), et

- les clones produisent un VHH qui présentent une affinité élevée pour le peptide A $\beta$ 2 : une inhibition de respectivement 56 % et 42 % pour le VHH-L35 et VHH-L1-3 est observée pour une concentration de  $3 \cdot 10^{-8}$ M de peptide A $\beta$ 42.

De manière plus précise, l'affinité des VHH L35 et L1-3 sont 30 respectivement de  $3 \cdot 10^{-8}$ M et  $6 \cdot 10^{-8}$ M.

Des études complémentaires mettant en œuvre des peptides chevauchant correspondant à des fragments du peptide A $\beta$ 42 ont montré que le VHH V31-1

réagit avec la partie carboxy terminale avec une affinité d'environ  $10^{-8}M$  et reconnaît bien par ELISA la forme fibrillaire de A $\beta$ 42, mais pas la forme A $\beta$ 40. En immuno-histochimie, sur des coupes de cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, un marquage intraneuronal sous forme de dépôts granulaires est observé avec le VHH 5 V31.

**Exemple 4 : Production de VHH solubles et analyse de la spécificité et de l'affinité des VHH solubles pour les bactéries exprimant à leur surface de la phosphorylcholine**

1) Immunisation d'alpagas avec du *Streptococcus pneumoniae* dénaturé par la chaleur 10 ou avec de la phosphorylcholine couplée à de l'albumine d'alpaga (ASA-PC).

Deux alpagas ont été immunisés respectivement avec deux antigènes, naturel (*S. pneumoniae* dénaturés par la chaleur) ou synthétique pour obtenir des anticorps monoclonaux anti-PC. Un mime de l'antigène de *S. pneumoniae* comprenant à la fois la PC et une partie de son support naturel a été synthétisé, c'est-à-dire la N-Acetyl-D-galactosamine liée en position 6 (6-O-PC- $\beta$ -D-GalNAc). Ce synthon a été couplé à de l'albumine d'alpaga. Après 5 immunisations, le sérum des alpagas contient des anticorps anti-PC. La spécificité des sérum pour la phosphorylcholine a été caractérisée en mesurant la concentration inhibitrice 50 % (IC50) des sérum vis-à-vis du polysaccharide C, qui correspond à de la PC couplée à des acides teichoïques. Les IC50 sont respectivement de 5 ng/ml pour l'alpaga immunisé avec le composé synthétique et de 0,5 ng/ml pour l'alpaga immunisé avec les *S. pneumoniae* dénaturés par la chaleur. 20

Le protocole utilisé est du même type que celui décrit à l'exemple 1. Pour ce qui concerne plus précisément l'obtention de l'antigène à base de *S. pneumoniae*,  $1,5 \cdot 10^8$  bactéries/ml sont chauffées toute une nuit à 37°C. 25

2) Purification des ARNm et synthèse des ADNc

Les lymphocytes sanguins sont préparés, à partir du sang hépariné prélevé à J<sub>131</sub>, par centrifugation en gradient de Ficoll, sensiblement dans les mêmes conditions que celles exposées à l'exemple 1. De manière plus précise, 300 ml de sang 30 d'alpagas immunisés dans les conditions précisées ci-dessus, à savoir l'un avec ASA-PC (PC couplée à de l'albumine d'alpaga) et l'autre avec du *Streptococcus pneumoniae*, dénaturé par la chaleur est collecté, en présence de 5ml d'anticoagulant

(Héparine). Ce sang est ensuite dilué au 1/2 dans du HBSS, puis réparti dans des tubes (environ 25 ml par tube) et avec de l'Histopaque (environ 15 ml par tube) (Histopaque 1077, Sigma) pour créer un gradient de densité. Les échantillons sont centrifugés 30 minutes à 400 g. Les cellules mononucléées qui forment un anneau à l'interface 5 plasma-Histopaque sont récupérées et lavées 3 fois dans du HBSS.

Les lymphocytes ainsi obtenus ( $10^8$  cellules) sont aliquotés puis les ARN sont isolés à partir de  $10^7$  cellules. Le culot de cellules est repris dans 500 µl de RNAXEL (Eurobio) et 100 µl de chloroforme. 0,4 g de billes (212-300 microns) sont ensuite ajoutés pour permettre le broyage des cellules par l'appareil FastPrep 10 (Q.BIOgene, Illkirch, France) pendant 2 fois 30 secondes à vitesse maximale. La phase supérieure est récupérée puis traitée au TRIzol (Invitrogen, San Diego, CA). Après lavage au chloroforme, précipitation à l'isopropanol et lavage à l'éthanol, le culot est repris dans 100 µl d'eau traitée au DEPC (0,01 %) puis précipité par du chlorure de lithium de concentration finale 2 molaire. Cette ultime étape assure la 15 pureté de l'échantillon d'ARN. Les aliquotes sont ensuite conservés à - 80°C.

L'ADNc est synthétisé à partir de 1,5 µg d'ARN dans les conditions suivantes : 2 µl de β-mercaptopropanoïde (1M) et 2 µl de RNAsine 40 U/µl (PROMEGA) sont ajoutés à 20 µl de la préparation d'ARNm purifié et le mélange est incubé 5 min à température ambiante, puis 2 heures à 42 °C, dans un volume de 96 µl contenant 400 20 UI de reverse transcriptase MLV superscript II (Invitrogen, San Diego, CA) dans du tampon MLV(GIBCO), 8,33 mM DTT, 500 µM de chacun des dNTPs et 6 à 30 pmoles d'amorce hexanucléotidique aléatoire (PdN6). On obtient alors les ADN complémentaires (ADNc) de ces ARN.

L'ADN ainsi synthétisé sert de matrice pour des réactions de PCR 25 pour l'amplification des gènes codant pour V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>2. Selon qu'il s'agit d'un anticorps conventionnel ou d'un anticorps à domaine variable unique, l'amplifiat a un poids moléculaire différent. En effet, la présence de la région C<sub>H</sub>1 et la longueur de la région charnière déterminent la taille de l'ADN amplifié. Ainsi, l'amplifiat correspondant à un anticorps conventionnel (IgG1) est de l'ordre de 900 pb, celui correspondant à une IgG 30 de type 2 (anticorps à domaine unique) est d'environ 690 pb, et celui correspondant à une IgG 3 (anticorps à domaine unique) est de 620 pb.

On peut ainsi discriminer les deux catégories d'anticorps et réamplifier les fragments d'environ 650 pb, contenant le V<sub>H</sub>H, par une seconde PCR. On obtient alors des fragments d'environ 400 pb correspondant au V<sub>H</sub>H. Lors de cette seconde PCR, des amorces spécifiques présentant chacune un site de clivage pour une 5 enzyme de restriction à site rare sont utilisées.

De manière plus précise, les fragments obtenus sont amplifiés par des réactions de PCR imbriquées (*nested PCR*) :

- 1<sup>ère</sup> réaction PCR

L'ADNc précédemment synthétisé (produit de 650 pb) correspondant au fragment VHH-charnière CH2 est amplifié à l'aide du couple d'amorces :  
10 - VHBACK A6 (5' GATGTGCAGCTGCAGGCGTCTGGRGGAGG 3') (SEQ ID NO :10) et  
- CH2FORT A4 (5' CGCCATCAAGGTACCAGTTGA 3') (SEQ OD NO :11).

Le mélange de PCR est composé de 5 µl d'ADNc, 30 pmol de 15 chaque amorce, 1 µl d'un mélange équimolaire de dNTP 25 mM, 3 µL de MgCl<sub>2</sub>, 5 µL de tampon de PCR 10X et de 5 unités de Hot Start Taq polymérase qui permet une dénaturation de l'ADN à température élevée (94°C pendant 15 minutes). La PCR se poursuit ensuite par 40 cycles successifs d'hybridation (30 secondes à 52°C), d'extension d'amorce (30 secondes à 72°C) et de dénaturation (30 secondes à 94°C). La réaction 20 se termine par une phase d'elongation terminale de 10 minutes à 72°.

Le produit d'amplification de 650 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL).

25 2<sup>ème</sup> réaction PCR

Un produit d'environ 400 pb correspondant au fragment VHH est amplifié à partir du produit de 650 pb, à l'aide des amorces suivantes :

- VHBACKA4 (*Sfi*I): 5' CATGCCATGACTCGCGGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAKGTSCA GCT 3' (SEQ ID NO: 12)
- 30 et
- VHFOR36 (*Not*I): 5' GGACTAGTTGCGGCCCCCTGAGGAGACGGTGACCTG 3' (SEQ ID NO: 13),

qui contiennent respectivement les sites de restriction des enzymes SfiI et NotI.

A la différence de la première PCR, il n'y a que 35 cycles d'amplification et la phase d'extension d'amorce dure une minute.

Le produit d'amplification de 400 pb est séparé par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium, dans du tampon TBE (Tris-Borate-EDTA), extrait du gel et purifié à l'aide du kit Nucleospin Extract (MACHEREY/NAGEL), puis quantifié.

### 3) Clonage des ADNc dans le vecteur pHEN2 (préparation des banques)

Le vecteur utilisé pour le clonage de V<sub>H</sub>H est le plasmide pHEN 2 (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk>). Il est de nature phagémique, c'est-à-dire qu'il contient deux origines de réPLICATION : d'une part celle du phage M13 (parasite naturel d'*E. coli*) qui permet la synthèse de particules phagémiques dont l'ADN est simple brin, et d'autre part celle du plasmide Col E1 (Bedbrook, JR. et al., Nature, 1979, 281, 447) qui permet la réPLICATION d'ADN double brin.

Lors du clonage, le gène codant pour V<sub>H</sub>H est inséré en phase avec le gène g III codant pour la région C-terminale, allant des acides aminés 198 à 406, de la protéine membranaire p III. Cette protéine de fusion V<sub>H</sub>H-pIII est sous la dépendance du promoteur lac inducible par l'IPTG, et est située à l'extrémité du phage.

L'induction par IPTG de cellules infectées par le phagémide permet la synthèse de la protéine de fusion V<sub>H</sub>H-pIII puis son exportation au niveau du périplasme. Ceci se fait sous la conduite de séquences leader Pel B, secondairement clivée par une protéase de la cellule hôte.

Après ligation des inserts dans les vecteurs, des transformations par choc thermique sont effectuées. Après optimisation du ratio VHH/pHEN2, la taille des deux banques est d'environ 2.10<sup>5</sup> CFU (Colony Forming Unit) pour chacune.

De manière plus précise, à partir de 11 µg de plasmide dans 23 µl d'eau, on effectue une coupure Sfi I (New England BioLabs, ) du côté 5' de l'ADN. Pour cela, on ajoute 30 unités d'enzyme, 3,5 µl de son tampon (NEB2) et 4 µl de BSA pour optimiser la réaction. De même, on prépare les inserts à partir de 1 µg de chaque ADN.

La digestion a lieu durant une nuit à 50°C ; puis on ajoute 2 µl de NaCl, 0,7 µl de tampon et 30 unités de NotI (Roche) pour effectuer la digestion du côté 3' pendant 5 heures à 37°C.

Les ADN (inserts et vecteurs) sont ensuite purifiés sur gel et quantifiés, dans les mêmes conditions que celles exposées ci-dessus.

Afin d'éviter une autoligation du vecteur lors de l'étape suivante, on effectue une déphosphorylation de celui-ci. A partir de 5 µg de pHEN2 purifié, on ajoute 25 µl d'eau, 5 µl de tampon 10X et 1 µl de phosphatase alcaline de veau (CIP). Après 30 minutes d'incubation à 20°C, la réaction est arrêtée avec de l'EDTA de concentration finale 20 mM puis l'échantillon est incubé 20 minutes à 75°C.

On réalise deux extractions phénol-chloroforme pour purifier le vecteur. L'ADN est ensuite précipité dans 0,1 volume d'acétate de sodium 3M (pH=5) et 3 volumes d'éthanol 100% pendant une nuit, puis est repris dans 50 µl d'eau.

Le plasmide pHEN2 linéarisé et déphosphorylé et le produit d'amplification de 400 pb préalablement digéré par les enzymes Sfi I et Not I, sont ensuite incubés en présence de ligase (T4 DNA LIGASE, NEW ENGLAND BIOLABS).

Puis, 5 µl de chaque ligation sont mis en présence de 50 µl de bactéries compétentes (XL2-Blue MRF' Ultracompetent Cells, Stratagene). Les tubes sont incubés une demi-heure dans la glace, puis 30 secondes à 42°C. Après ce choc thermique, on ajoute 900 µl de solution SOC (20 g de bacto-tryptone, 5 g de bacto-yeast extract, 0,5 g NaCl qsp 1 l d'eau plus 20 mM de glucose) pour permettre aux bactéries de récupérer et croître pendant 1H à 37°C. 100 µl de chaque test sont étalés sur boîte de Pétri, en milieu 2YTAG (Yeast Tryptone Ampicilline Glucose).

Le phagemide contient un gène de résistance à l'ampicilin qui permet la sélection positive des cellules transfectées, lors de la croissance sur milieu antibiotique. Les colonies obtenues sont ensuite comptées. La ligation correspondant au meilleur ratio (ratio insert:vecteur 2:1) est de nouveau effectuée, en grande quantité. Puis on réalise des électroporations en masse. Pour chacun des deux alpagas, il est nécessaire de préparer 8 tubes de 15 ml avec 1 ml de milieu SOC. Sur glace, dans 8 tubes Eppendorf froids, 40 µl de bactéries (SURE Electroporation-Competent Cells, Stratagene) sont mis au contact de 4 µl de vecteur d'expression dans chacun des

8 tubes. Après 5 minutes, les 44 µl de culture sont déposés dans une cuve d'électroporation refroidie à 4°C. L'appareil (Bio-Rad) est alors réglé sur un voltage de 2,5 kV, une capacitance de 25 µF et une résistance de 200 Ω. Immédiatement après électroporation, le milieu SOC est aspiré avec une pipette Pasteur de façon à le rajouter aux bactéries et les transférer au plus vite dans le Falcon ensuite placé à 37°C sous agitation pendant une heure. 10 et 100 µl de cette préculture sont ensuite étalés sur boîte de Pétri 2 YTAG et le reste des 8 tubes est étalé sur plaque "screening" 500 cm<sup>2</sup> (Fisher Scientific Labosi, Elancourt, France). Toutes les boîtes sont placées à 37°C pendant une nuit. Les colonies résistantes sont remises en suspension dans du milieu YT2 et la banque est conservée à -80°C dans du glycérol.

4) Contrôle de la diversité de la banque

10 colonies résistantes de chaque alpaga sont de nouveau mises en culture dans 5 ml de milieu 2YTAG. A partir de 4 ml de celles-ci, l'ADN plasmidique est extrait à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne).

La présence d'un insert est contrôlée par restriction enzymatique de l'ADN plasmidique à l'aide des enzymes de restriction *Sfi* I et *Not* I (BIOLABS) en suivant les instructions du fabricant, puis déposé sur gel d'agarose 1% pour vérifier la présence de l'insert.

La diversité de la banque est contrôlée par amplification de l'ADN plasmidique, par PCR, à l'aide du couple d'amorces M 13-40 (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3', SEQ ID NO :50) et Myc Seq 10 (5'-CTCTTCTGAGATGAGTTTG-3', SEQ ID NO :51). L'amplification se fait lors de 30 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 54°C, et 30 secondes à 72°C précédés par 5 minutes à 94°C et suivis par 10 minutes à 72°C. Les produits de PCR sont déposés sur gel d'agarose 1% pour vérifier la présence de l'amplifiat. Puis ils sont envoyés à la société Génome Express S.A. (Grenoble, France) avec les amorces utilisées, pour être séquencés. Les séquences sont ensuite analysées grâce au logiciel DNA Strider 1.3f11, puis alignées par le logiciel CLUSTAL W.

5) Criblage de la banque de VHH anti-phosphorylcholine par la technique d'exposition des phages (sélection des phages VHH spécifiques de la phosphorylcholine)

a) Préparation des phages

5        50 µl de banque de chaque alpaga sont dilués dans 1 ml de milieu 2 YTAG. Les bactéries sont mises sous agitation à 37°C pendant 3 heures puis sont utilisées pour ensemencer 100 ml de 2 YTAG jusqu'à obtention d'une DO de 0,044 à 600 nm ; soit environ 250 µl de la préculture. La culture est également mise sous agitation à 37°C jusqu'à obtention d'une DO à 600 nm de l'ordre de 0,5 ; c'est-à-dire en 10 début de phase exponentielle de croissance des bactéries. 5. 10<sup>11</sup> PFU de phage Helper M13K07 (Viera J et al., Methods Enzymol., 1987, 153, 3-11) résistant à la kanamycine sont ajoutés à la culture qui est ensuite incubée 30 minutes à 37°C sans agitation puis 30 minutes à 37°C avec agitation.

15      Après centrifugation pendant 15 minutes à 4°C et 4 000 g, le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans 300 ml de 2YTAG contenant de la Kanamycine à 50 µg/ml. La culture est incubée durant une nuit à 30°C sous agitation.

20      Les phages en suspension sont centrifugés deux fois pour éliminer les bactéries (10 minutes, 8 000 rpm, 4°C, puis précipités pendant 4 heures à 4°C en présence de 0,04 volume de PEG-NaCl. Le précipitat est centrifugé une demi-heure à 8 000 rpm et 4°C, puis repris dans 1 ml de PBS stérile.

b) Titrage des phages

25      La souche *d'E. coli* utilisée pour le titrage est TG1 (Stratagène, La Jolla, CA), dans laquelle le pili sexuel est codé par un transposon. Une colonie de TG1 sur milieu minimum, est repiquée dans 2 ml de 2YT. Cette préculture est incubée durant une nuit à 37°C puis sert à l'ensemencement de 50 ml de 2 YT jusqu'à obtention d'une DO de 0,045. La culture est mise sous agitation à 37°C jusqu'à ce que la DO atteigne 0,5 à 600 nm, c'est à dire environ 2 heures.

30      5 aliquotes de 50 µl de TG1 sont ensuite additionnés de 1 µl de phage précédemment préparé, à différentes dilutions (10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-8</sup>). Après 15 minutes à température ambiante, les aliquotes sont étalées sur boîte de Pétri 2 YTAG et incubées une nuit à 37°C. Le titrage est enfin effectué lorsque les colonies sélectionnées sont comptées.

**c) Criblage**

Le criblage s'effectue à partir de  $2,5 \cdot 10^{11}$  phages/ml dans 100 µl de PBS, auxquels est ajouté 1 µl de GPB (Gal-Nac-PC-Biotine) à 1mg/ml (Figure 5). Le mélange est incubé 2 heures à température ambiante sous agitation, puis additionné de 5 900 µl de PBS et 100 µl de gélatine à 0,5%. Les phages ayant une affinité pour la PC sont alors liés à GPB. Après 10 minutes d'agitation, le mélange est transféré dans un immunotube préalablement coaté par de la neutravidine. Celle-ci ayant une affinité très élevée pour la biotine (de l'ordre de  $10^{13}$ ), les phages liés à GPB se lient aux parois des immunotubes placés une heure sous agitation à température ambiante. Les 10 tubes sont ensuite lavés 10 fois par du PBS-tween 0,1%, puis 10 fois en PBS. On ajoute alors 1 ml de DTT 50 mM dans les tubes que l'on agite durant une demi-heure, pour casser la liaison dissulfure PC-Biotine. 500 µl sont conservés à 4°C et 500 µl sont incubés avec 5,5 ml de TG1 en phase exponentielle dans un tube de 15 ml, pendant 45 minutes, à 37°C. En parallèle, les immunotubes sont remplis par 4 ml de 15 TG1. Les deux tubes sont alors réunis puis centrifugés 10 minutes, à 4°C et 4 500 rpm. Le culot est repris dans 2 mL de 2 YT puis étalé sur boites 2 YTAG. 100 µl aux dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  sont étalés sur boîtes de Pétri et le reste sur grande boite de "screening". Après culture durant la nuit à 37°C, les colonies des boîtes de Pétri sont comptées pour estimer la proportion de phages sélectionnés par leur affinité 20 pour la PC. Les grandes boîtes sont raclées en présence de 2 ml de 2 YT puis les bactéries sont conservées dans 2 ml de glycérol 40%, à - 20°C. Auparavant, 10 µl de bactéries servent àensemencer 50 ml de 2 YTAG pour préparer de nouveaux phages selon le même protocole que précédemment. Une fois le PEG-NaCl bien éliminé, le 25 culot est repris dans 500 µl de PBS. Les phages sont de nouveau titrés puis conservés à 4°C.

Afin de ne pas sélectionner les phages ayant une affinité pour l'agent saturant, celui-ci est changé à chaque tour de criblage. Ainsi, lors du premier tour l'agent saturant des immunotubes est la gélatine à 0,5% ; au second tour, du lait 2% dialysé est utilisé et au troisième tour on utilise de nouveau de la gélatine.

**30 d) Résultats**

Les bactéries sont infectées par un phage helper (M13K07), comme précisé ci-dessus, qui permet la réPLICATION d'ADN sous forme simple-brin. La

majorité des virions produits présente alors la protéine de fusion VHH-pIII exprimée à la surface, ce qui permet la sélection des virions les plus avides vis-à-vis du polysaccharide C. A l'issue du 1<sup>er</sup> tour de criblage,  $2.10^6$  phages (output) sont susceptibles de reconnaître le polysaccharide C parmi les  $2,5.10^{11}$  initialement présents (input), ce 5 qui correspond à la fixation d'un phage sur 105. Après le second tour de criblage, 1% des phages sélectionnés précédemment est conservé. Le 3<sup>ème</sup> tour de criblage est effectué 2 fois, et les résultats sont similaires. En effet, le rendement de fixation est à chaque fois de  $10^{-4}$ . Cette dernière baisse de rendement pourrait être due à des conditions plus drastiques (augmentation de la stringence et diminution de la concentration de GPB). 10

**Tableau V : Criblage de la banque de VHH obtenue à partir de l'alpaga immunisé par**

*S. pneumoniae*

	Conditions	Input	output	$\rho=\text{input/output}$
Criblage 1	0,1% Tween GPB $10^{-6}$ M	$2,5.10^{11}$ φ/ml	$2.10^6$ φ/ml	$10^{-5}$
Criblage 2	0,3% Tween GPB $10^{-7}$ M	$10^{12}$ φ/ml	$3.10^{10}$ φ/ml	$10^{-2}$
Criblage 3	0,5% Tween GPB $10^{-8}$ M	$10^{11}$ φ/ml	$10^7$ φ/ml	$10^{-4}$
Criblage 3bis	0,5% Tween GPB $10^{-8}$ M	$4.10^{11}$ φ/ml	$4.10^7$ φ/ml	$10^{-4}$

15 **Exemple 5 : Sélection de phages-VHH spécifiques de la phosphorylcholine**

Après le 2<sup>ème</sup> et le 3<sup>ème</sup> tour de criblage, des phages pris au hasard sont testés par ELISA direct pour leur affinité pour le polysaccharide C. Au total 11 phagémides sont sélectionnés et les séquences sont données dans la figure 6. Ces anticorps sont exprimés sous forme soluble en dehors du contexte du phage.

20 Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

### REVENDICATIONS

1°) Utilisation d'anticorps à chaîne unique de camélidés, sélectionnés dans le groupe constitué par des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes ne secrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV et des anticorps comprenant des fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, pour la détection de la présence d'un agent pathogène ne secrétant pas de toxine ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV ou pour la détection d'une maladie comprenant des dépôts de substances amyloïdes insolubles.

5 2°) Banque immune d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigés contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2937.

10 3°) Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, caractérisé en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

15 - la culture de la banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps selon la revendication 2, dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,

20 - la mise en contact desdits fragments variables avec le peptide  $\beta$ -amyloïde 1-42, dans des conditions permettant la liaison dudit fragment variable d'anticorps avec ledit peptide, et

25 - l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps capables de se lier audit peptide.

4°) Fragment variable d'anticorps selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 3, 5, 7 et 9.

5°) Anticorps ou fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable selon la revendication 3 ou la revendication

30 4.

6°) Molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini à la revendication 3.

7°) Molécule d'ADNc selon la revendication 6, caractérisée en ce qu'elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 2, 4, 6 et 8.

8°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend au moins 5 une molécule d'ADNc selon la revendication 6 ou la revendication 7.

9°) Cellule hôte procaryote ou eucaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 6 ou la revendication 7 ou un vecteur recombinant selon la revendication 8.

10 10°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2933.

11°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2934.

15 12°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2935.

13°) Cellule hôte procaryote selon la revendication 9, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), 28 rue du Docteur 20 Roux, 75724 Paris Cedex 15, le 20 septembre 2002, sous le numéro I-2936.

14°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la revendication 4 ou bien d'un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 5 pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection de maladies dans lesquelles on observe un dépôt de substances amyloïdes insolubles, 25 dans un ou plusieurs organes ou tissus et notamment de maladies neuroagrégatives.

15°) Kit de diagnostic de maladies comprenant des dépôts de substances amyloïdes insolubles, dans un ou plusieurs organes ou tissus et notamment de maladies neuroagrégatives, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la revendication 4 ou bien un anticorps 30 ou un fragment d'anticorps selon la revendication 5.

16°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la

revendication 4 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 5, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

17°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps selon la revendication 3 ou la revendication 4 ou bien d'un anticorps ou un fragment d'anticorps selon 5 la revendication 5 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies comprenant le dépôt, dans un ou plusieurs organes ou tissus, de substances amyloïdes.

18°) Utilisation selon la revendication 17, caractérisée en ce que lesdites maladies sont des maladies neuroagrégatives, notamment la maladie 10 d'Alzheimer.

19°) Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique, dirigé contre des agents pathogènes ne secrétant pas de toxines, caractérisé en ce qu'il est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de 15 mammifères et en ce qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs surfaces des molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, dans des conditions 20 permettant l'expression desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une molécule d'adhésion ou des agents pathogènes exprimant à leur surface des molécules d'adhésion, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments variables d'anticorps avec au moins une desdites molécules d'adhésion, et

25 - l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-molécule d'adhésion capables de se lier à la molécule d'adhésion correspondante.

20°) Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique selon la revendication 19, caractérisé en ce que ladite molécule d'adhésion est la 30 phosphorylcholine, en ce que ledit fragment variable d'anticorps est capable de reconnaître les agents pathogènes ou des fragments de ceux-ci à l'intérieur ou à l'extérieur de cellules eucaryotes ou de tissus ou d'organes de mammifères et en ce

qu'il est codé par un ADNc isolé par un procédé comprenant au moins les étapes suivantes :

- la culture d'une banque d'ADNc de fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigés contre des agents pathogènes, exprimant à leurs 5 surfaces de la phosphorylcholine (VHH-anti-phosphorylcholine), dans des conditions permettant l'expression desdits fragments variables,

- la mise en contact desdits fragments variables d'anticorps avec de la phosphorylcholine ou des agents pathogènes exprimant à leur surface de la phosphorylcholine, dans des conditions permettant la liaison desdits fragments 10 variables d'anticorps avec la phosphorylcholine, et

- l'isolement de l'ADNc correspondant aux fragments variables d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine capables de se lier à la phosphorylcholine.

21°) Fragment variable d'anticorps selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il présente une séquence en acides aminés sélectionnée dans le 15 groupe constitué par les séquences SEQ ID NO :29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47 et 49.

22°) Anticorps ou fragment d'anticorps, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable selon l'une quelconque des revendications 19 à 21.

23°) Molécule d'ADNc, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par le procédé tel que défini à la revendication 19 ou la revendication 20.

24°) Molécule d'ADNc selon la revendication 23, caractérisée en ce qu'elle présente une séquence nucléotidique sélectionnée dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO:28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46 et 48.

25°) Vecteur recombinant caractérisé en ce qu'il comprend au moins une molécule d'ADNc selon la revendication 23 ou la revendication 24.

26°) Cellule hôte eucaryote ou procaryote, caractérisée en ce qu'elle est modifiée par une molécule d'acide nucléique selon la revendication 23 ou la revendication 24 ou un vecteur selon la revendication 25.

27°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, pour la préparation d'un

réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une molécule d'adhésion à leur surface.

28°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou bien d'un anticorps ou d'un fragment 5 d'anticorps dérivés, selon la revendication 22 pour la préparation d'un réactif de diagnostic destiné à la détection des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment la molécule d'adhésion phosphorylcholine à leur surface et notamment les maladies infectieuses des voies respiratoires.

29°) Kit de diagnostic des maladies infectieuses dues à des agents 10 pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou la revendication 21 ou bien un anticorps ou un fragment d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps selon la revendication 22.

15 30°) Composition pharmaceutique comprenant des anticorps de camélidés dirigés contre des agents pathogènes ou leurs fragments, caractérisée en ce qu'ils ne secrètent pas de toxine et qu'ils ne sont pas des éléments constitutifs de la protéase NS3 de HCV.

31°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle 20 comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne selon la revendication 19.

32°) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou la revendication 21 ou bien un anticorps ou un fragment 25 d'anticorps comprenant ledit fragment variable d'anticorps selon la revendication 22, associé à au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

33°) Composition pharmaceutique selon la revendication 32, caractérisée en ce que lesdits véhicules pharmaceutiquement acceptables sont appropriés à une administration intranasale.

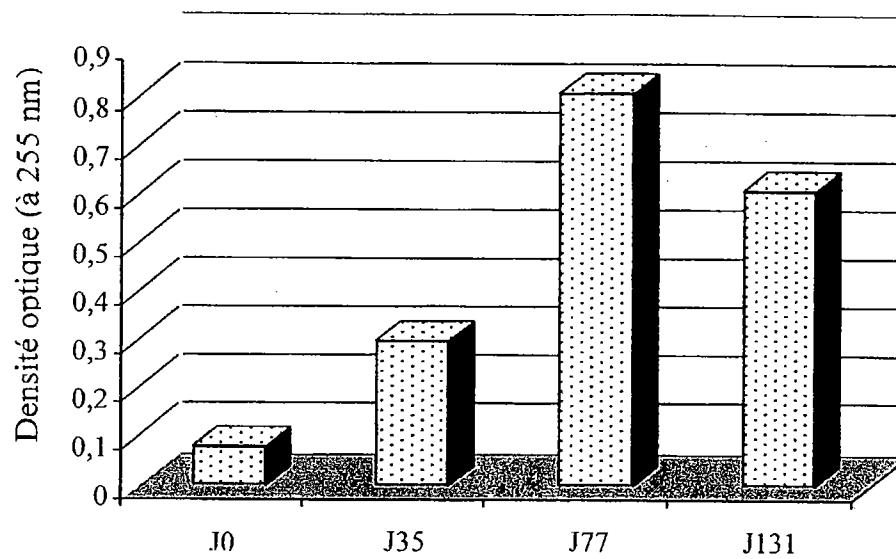
30 34°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH dirigé contre toutes les molécules d'adhésion de la paroi bactérienne, pour la préparation d'un

médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment au moins une molécule d'adhésion à leur surface.

35°) Utilisation d'un fragment variable d'anticorps VHH-anti-phosphorylcholine selon la revendication 20 ou la revendication 21 ou bien d'un anticorps ou un fragment d'anticorps selon la revendication 22, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies infectieuses dues à des agents pathogènes qui expriment de la phosphorylcholine à leur surface.

36°) Utilisation selon la revendication 35, caractérisée en ce que lesdites maladies sont des maladies infectieuses qui colonisent les muqueuses, et plus 10 particulièrement des maladies infectieuses des voies respiratoires.

1 / 8

**Figure 1**

		CDR 1	CDR 2	CDR 3
VHH-03	ADVQLQASGGG	L VQPGGSPGLSCAASGGFTFR TSDMS	W V RQAPGK GL E W VS YIDSIGSGRKLYADSAGK	VYYC VYVQGTQTVSSSEPKTPKP
VHH-05	ADVQLQASGGG	L VQPGESLTISCAAYGFTLD	W F RQAPGK ER E G VA CIGSSLGRTDYADSVK	VYYCAA KIGGAMCVPENEYDY-----
VHH-07	GRCQLOASGGG	L VQPGSLLRISCAASGGFTLE	W F RQAPGK ER V G IS CISSNGRADYVDSVKG	VYYCAA AMWKCQLMMSSSNYTKI
VHH-25	GRGPLOASGGG	L VQPGSLTLCIASGGFTLD	W F RQAPGK KR E R VS CTGPNGESTNYADSVK	VALPOCTWMARMDYDYS-----
VHH-11	VQLQASGGG	L VQAGGSNLNLSCAASGRSFS	W F RQAPGK ER E F VG AISWIGGRYYAVSVKG	VYYCAA KGSDGDYFSIQKYDS-----
VHH-33	ADVQLQASGGG	L AQAGGSLRLSCAASGGTDS	W Y RQAPGK QR E L VA AIAR-DARTNYADSLSKG	VYYCAA EALMHQTQPRHY-----
		INVMA	INVMIA	

Mutations des acides aminés des FR1 et FR2 entre VH et VHH

VH	VHH-03	VHH-05	VHH-07	VHH-25	VHH-11	VHH-33
VH	L11	V37	G44	L45	W47	
VHH	S11	F37	E44	R45	G47	R47

Figure 2

3/8

61 AEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGS-TFRI NRMG WYRQAPGKQRELVA  
L35 AEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGS-TFSI NVIG WYRQAPGKQRELVA  
L1-3 AEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCSASASTTFSM NTMA WHRQAPGKQRSLVA  
V31-1 AEVQLQASGGGSVQPQGGSLRLSCAASGF-IFGW STMS WVRQAPGKGLEWVS  
\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:

61 SINSGG-STNYADSVKG RFTISRDNAKGTVNLTMNSLKPEDTAVYYC  
L35 GISRSG-NTNYADSVKG RFTISRDYAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC  
L1-3 LIGATH-SINYEDSVKG RFTISRDNAKNTVYLQMSSLKPEDTAVYYC  
V31-1 TISGGGSATTYTDSVKKG RFTISRDRAKNTLYLQMNSLKPEDTAIYYC  
\*. .\* \*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:

61 NR----VTPWP---Y WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 3)  
L35 HS----KTYLLHM-Y WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 5)  
L1-3 ND----WYWQMKGGS WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO: 7)  
V31-1 NADVSTGFRYQRKDY WGRGTQVTVSSEPKTPKPQP (SEQ ID NO: 9)  
\*\* :\*\*\*\*\*

**Figure 3**

4 / 8

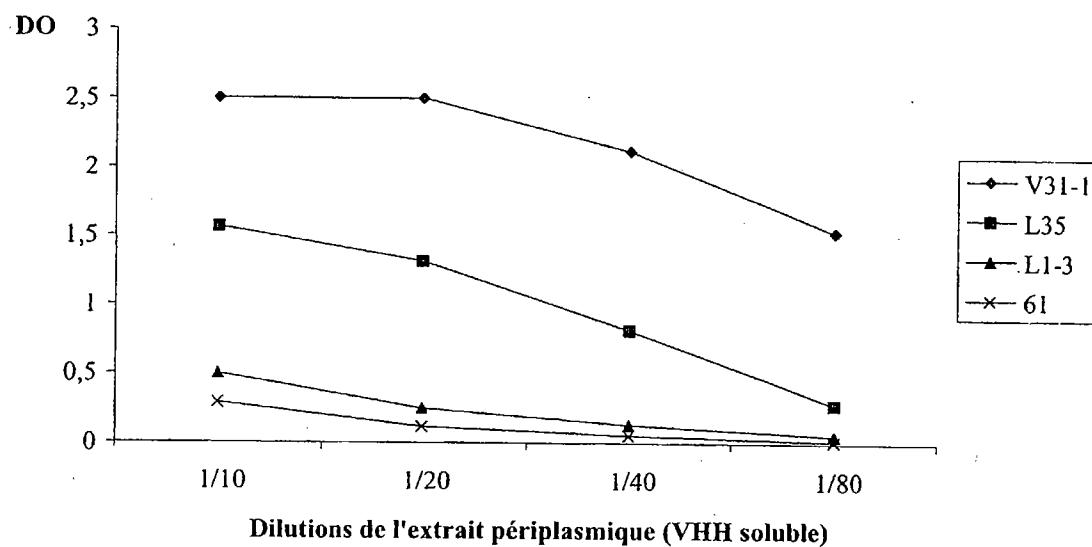


Figure 4

5 / 8

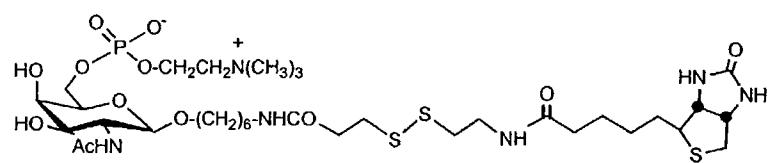


FIGURE 5

6 / 8

## Clone 1

GAGGTGCAGCTGcAGGCGTCTGGGGGGGCTTGGTGGAACCTGGGGGTC  
 TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAAAGCATCTGGTCAATGTAATGG  
 ACTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAAGCAGCGCAGTTGGTCCAGCTATT  
 ACTCGTGGTGGTGTACAAAACATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTAC  
 CATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACATGATGTTCCCTGCAAATGCACAGCC  
TGCTACCTGAGGACACGGCGTCTATTATTGCCATGCGCGTACATGGaga  
GACTATTGGGCCAGGGGAccCaggtCACGTCTCCTCAGCGGCCGACA  
 TCATCATCACCATCACGGGCCGAGAACAAAA

## Clone 2

GAGGTGCAGCTGCAGGCCAGGCTCTGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTC  
 TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGCAAGCATCTCAGTATCGATGGCA  
 TGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGGAAAGCAGCGCAGTTGGTCCAGGT  
 ATTACTAGTGGTGGTAGCACAAAACATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT  
 CACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACATGATGTTCCCTGCAAATGCGCA  
 GCCTGCTACCTGAGAACACGCCGTCTATTACTGTCAATGCGCGTACATGG  
 AGAGACTATTGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCAGCGGCCG  
 ACATCATC

## Clone 3

GAGGTGCAGCTGCAGGCCAGGCTCTGGGGAGGATTGGTGCAGACCGGGGTC  
 TCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCTGGACGCACCTTCAGCAGCTACGCCA  
 TGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGAGCGAGAGTTGTAGCAGCT  
 GTTAGGCCAGAGTGGTGGTACAAAACATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  
 ATTACCCATCTCCAGAGACAACGCCAAGTTCACGGTGTATCTGCAAACGA  
 ACAGCCTGAAACCTGAGGACACGCCCTTATTACTGTGCAGCCACTACG  
 AAACCCTTTGCCCCGTACGAATGTTCAACCAGAGTACTGGGCCAGGG

## Clone 4

GATGTCCAGCTGCAGGCCAGGCTTGGAGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGGTC  
 TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAGCATCTCAGTAACCATGCCA  
 TGGGCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGGAAAGCAGCGCAGTTCGTGCAGCT  
 ATTTTAGTGGCGGTGCGATAAAACTATGCAGACTTCGTGAAGGGCCGATT  
 CACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACATCGGTGTATCTGCAAATGAACA  
 AACTGAAACCTGAGGACACGCCGTCTATCCCTGTAATGCGTGGAGGTTA  
 GGTTATGACTATTGGGCCAGGGGACCCAGGTACCGTCTCAGCGGC  
 CGCACATCATC

FIGURE 6.1

7 / 8

## Clone 5

GATGTGCAGCTGCAGCGTCTGGGGAGGCTTGGTGCAGCCTGGGGTC  
 TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAATCGCTTCAGAGTCAGTACCA  
 TGGGCTGGTACCGCCAGGCTCCAGGAAGCAGCGCAGTTGGTCGCAACT  
 ATTTCTAGTGGTAGTACAAACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT  
 CACCATCTACAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACA  
 GCCTGAAACCTGAGGACACGCCGCTATTACTGTAATGCAAATACAGGA  
 CTCCGTACCCCTTCGTTCTGGGCCAGGGACCCAGGTACCGTCTCCTC  
 AGCGGCC

## Clone 7

GAGGTgCAGCTGCAGCGTCTGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTC  
 TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGAACGCACCTTCAGTAACGCTCGCA  
 TGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGACAGGAGCGTGAGTTGTAGCGGCT  
 ATTAGCTGGAGTGGTACTACCACGAACATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  
 ATTACCCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGA  
 ACAGCCTGAAGCCTGAGGACACGCCGTTATTACTGCGCAGCAGATGGT  
 TCCTGGGGAGTCTGCAACAATGTGTATGACTACTGGGCCAGGGAC  
 CCAGGTACCGTCTCCAGCGCCACATCATCACCATCACGG

## Clone 8

GAGGTGCAGCTGCAGCGTCTGGAGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTC  
 TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAGGCACCTTGAGTAGCTATGTCA  
 TGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGAGCGTGAGATTGTAGCAGCT  
 ATTAGGTCTAGTGGTAGCGCATGGTATGCAGACTCCGTGCAGGGCCGATT  
 CACCATCTCCAGAGACGGGCCAGGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACA  
 GCCTGAAACCTGAGGACACGCCGTTACTACTGTCAGCAAAGAAAGGA  
 ATTACGGTCTTACTCGTACTCGTATGACTACTGGGCCAGGGAC  
 CCAGGTACCGTCTCCT

## Clone 9

CGTGTCCAGCTGCAGCGTCTGGAGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTC  
 ACTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACGCTCAGTAGTTATGCCA  
 TGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGATCGTGAGTTGTAGCAGCT  
 ATTAGCTGGAGTGGTACTAGGACATCGTATGCGGACTCCGTGAAGGGCCG  
 ATTACCCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATATCTGCAAATGA  
 ACAGCCTGAAACCGAGGACACGCCGTTATTACTGTCGATGCGTTCA  
 ATGCGTTCCAACCTATACCGTATGAGGCCCGCATGACTATGACTA  
 CTGGGCCAGGGACCCAGGTACCGTCTCCTCAGC

8 / 8

## Clone 10

GAGGTGCAGCGTGCAGGCCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGCTC  
TCTGAGACTCGCCTGTGCGGCCCTGGACGCACCTTCAGGAGCTATGCCA  
TGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGAGCGCGAGGGGTCTCATGT  
ATTAGTAGTAATGATGGTAGCACATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCG  
ATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAAACACGATGTATCTGCAAATGA  
ACGGCCTGAAACCTGAGGACACGGCGTTTATTACTGTGCTTCAGCAAAA  
TGCTATAGGGACGTTCTACCGGAGTGCCGGGATGATTGTGCCCTTA  
CGAGTAT

## Clone 11

TGTGAGCTGCAGCGTCTGGGGAGGCTGGTGCAGCCTGGGGGTCTCT  
GAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGAAAGCATCTCAGTAACCATGCCATGG  
GCTGGTACCGCCAGCCTCCAGGAAGCAGCGAGTTCGTCGCAAATATT  
TTTAGTGGCGGTGCATAAAACTATGCAGACTTCGTGAAGGGCCGATTCA  
CATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAAAC  
TGAAACCTGAGGACACGGCGTCTATCTGTAAATGCGTGGAGGTTAGGT  
TATGACTACTGGGCCAGGGAccCaggtcACCGTCTCCTCAGCGGCC  
ACAT

## Clone 12

GAGGTGCAGCGTGCAGGCCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGACTC  
TCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGACGCACCTTCAGTACATATAACA  
TGGCGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGAGCGTGAGCTGTAGCAGCT  
ATCACTTGGAGTGGAGGTACATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATT  
CACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACGGTATCTCTGCAAATGGACA  
GCCTGAAACCCGAGGAACACGGCGTTTATTACTGTACACGATCGCGCGT  
GCTAGTTACTTCGGGACCCCACGTGACTTCGTTCTGGGCCAGGGAC  
CCAGGTACCGTCTCCTCAGCGGCC

FIGURE 6.3

0226-105-SEQ.ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT PASTEUR  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
ROUGEON, Francois  
LAFAYE, Pierre

<120> Fragments variables d'anticorps de camélidés  
à chaîne unique et leurs applications pour le  
diagnostic et le traitement de pathologies diverses

<130> S226EXT105

<160> 51

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: Peptide synthétique

<400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys  
1 5 10 15

Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile  
20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Val Val Ile Ala  
35 40

<210> 2  
<211> 399  
<212> DNA  
<213> Camelidae

0226-105-SEQ. ST25

<220>

<221> CDS

<222>. (1)..(399)

<223>

<400>	2	
gcc gag gtg cag ctg cag gcg tct gga gga ggc ttg gtg cag gct ggg		48
Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly		
1 5 10 15		
ggg tct ctg aga ctc tcc tgc gca gcc tct gga agc acc ttc agg atc		96
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile		
20 25 30		
aat cgc atg ggc tgg tac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc gag ttg		144
Asn Arg Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu		
35 40 45		
gtc gct agt att aat agt ggc ggt agt aca aac tat gca gac tcc gtg		192
Val Ala Ser Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val		
50 55 60		
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag ggc aca gtg aat		240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Gly Thr Val Asn		
65 70 75 80		
ctg aca atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat tac tgt		288
Leu Thr Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
aat cga gta acc ccc tgg cct tac tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc		336
Asn Arg Val Thr Pro Trp Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr		
100 105 110		
gtc tcc tca gcg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat ctg		384
Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu		
115 120 125		
aat ggg gcc gca tag		399
Asn Gly Ala Ala		
130		

<210> 3

<211> 132

<212> PRT

<213> Camelidae

<400> 3

Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly  
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ile  
20 25 30

0226-105-SEQ.ST25

Asn Arg Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu  
 35 40 45

Val Ala Ser Ile Asn Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Gly Thr Val Asn  
 65 70 75 80

Leu Thr Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Asn Arg Val Thr Pro Trp Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu  
 115 120 125

Asn Gly Ala Ala  
 130

<210> 4

<211> 405

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(405)

<223>

<400> 4  
 gcc gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag gct ggg 48  
 Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly  
 1 5 10 15

ggg tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga agc acc ttc agt atc 96  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ile  
 20 25 30

aat gtc ata gga tgg tac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc gag ttg 144  
 Asn Val Ile Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu  
 35 40 45

gtc gca ggt att agt cgt agt ggt aac aca aat tat gca gac tcc gta 192  
 Val Ala Gly Ile Ser Arg Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

gag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac tac gcc aag aac aca gtg tat 240  
 Page 3

0226-105-SEQ.ST25

Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Tyr	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr	
65					70					75					80	
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	aaa	cct	gag	gac	acg	gcc	gtc	tat	tat	tgt	288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85			90		95						
cat	tcc	aag	acc	tat	ctt	cta	cat	atg	tac	tgg	ggc	cag	ggg	acc	cag	336
His	Ser	Lys	Thr	Tyr	Leu	Leu	His	Met	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	
					100			105		110						
gtc	acc	gtc	tcc	tca	gcg	gcc	gca	gaa	caa	aaa	ctc	atc	tca	gaa	gag	384
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	
					115			120		125						
gat	ctg	aat	ggg	gcc	gca	tag										405
Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala											
					130											

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 134

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 5

Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Ala	Gly
1				5				10			15				

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Thr	Phe	Ser	Ile
				20				25			30				

Asn	Val	Ile	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu
				35			40				45				

Val	Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Ser	Gly	Asn	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
				50			55			60					

Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Tyr	Ala	Lys	Asn	Thr	Val	Tyr
65					70					75				80	

Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85			90			95				

His	Ser	Lys	Thr	Tyr	Leu	Leu	His	Met	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln
					100			105			110				

Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ala	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu
					115			120		125				

Asp	Leu	Asn	Gly	Ala	Ala										
					130										

0226-105-SEQ.ST25

<210> 6  
<211> 411  
<212> DNA  
<213> camelidae

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(411)  
<223>

<400> 6  
gcc gag gtc cag ctg cag gcg tct gga gga ggc ttg gtg cag gct ggg 48  
Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly  
1 5 10 15  
ggg tct ctg aga ctc tcc tgt tca gcc tct gca agc acc acc ttc agt 96  
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ala Ser Thr Thr Phe Ser  
20 25 30  
atg aat acc atg gcc tgg cac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc agc 144  
Met Asn Thr Met Ala Trp His Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Ser  
35 40 45  
ttg gtc gcc ctt att gga gca act cat agt att aac tat gaa gac tcc 192  
Leu Val Ala Leu Ile Gly Ala Thr His Ser Ile Asn Tyr Glu Asp Ser  
50 55 60  
gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac act gtg 240  
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val  
65 70 75 80  
tat tta caa atg agc agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat tac 288  
Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
85 90 95  
tgt aat gac tgg tat tgg caa atg aaa ggg ggt tcc tgg ggc cag ggg 336  
Cys Asn Asp Trp Tyr Trp Gln Met Lys Gly Gly Ser Trp Gly Gln Gly  
100 105 110  
acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca 384  
Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
115 120 125  
gaa gag gat ctg aat ggg gcc gca tag 411  
Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
130 135

<210> 7  
<211> 136  
<212> PRT  
<213> camelidae

0226-105-SEQ.ST25

&lt;400&gt; 7

Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ala Ser Thr Thr Phe Ser  
 20 25 30

Met Asn Thr Met Ala Trp His Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Ser  
 35 40 45

Leu Val Ala Leu Ile Gly Ala Thr His Ser Ile Asn Tyr Glu Asp Ser  
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Asn Asp Trp Tyr Trp Gln Met Lys Gly Gly Ser Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser  
 115 120 125

Glu Glu Asp Leu Asn Gly Ala Ala  
 130 135

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 450

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(450)

&lt;223&gt;

<400> 8  
 gcc gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc tcg gtg cag cct ggg  
 Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15

ggg tct ctg aga ctc tcc tgc gca gcc tct gga ttc atc ttc ggt tgg  
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Gly Trp  
 20 25 30

tct act atg agc tgg gtc cgc cag gct cca gga aag ggg tta gag tgg

0226-105-SEQ.ST25

Ser Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp			
35	40	45	
gtc tca act att tct gga gga ggt agt gcc aca acc tat aca gac tcc			192
Val Ser Thr Ile Ser Gly Gly Ser Ala Thr Thr Tyr Thr Asp Ser			
50	55	60	
gtg aag ggc cga ttc acc att tcc aga gac agg gcc aag aac acg ttg			240
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Arg Ala Lys Asn Thr Leu			
65	70	75	80
tat ctg caa atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc atc tat tac			288
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr			
85	90	95	
tgt aat gca gat gtg agt acg ggt ttc cgg tat cag cgt aaa gac tac			336
Cys Asn Ala Asp Val Ser Thr Gly Phe Arg Tyr Gln Arg Lys Asp Tyr			
100	105	110	
tgg ggc cgg ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca gaa ccc aag aca cca			384
Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro			
115	120	125	
aaa cca caa cca gcg gcc gca gaa caa aaa ctc atc tca gaa gag gat			432
Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp			
130	135	140	
ctg aat ggg gcc gca tag			450
Leu Asn Gly Ala Ala			
145			
<210> 9			
<211> 149			
<212> PRT			
<213> camelidae			
 <400> 9			
Ala Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly			
1	5	10	15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Gly Trp			
20	25	30	
Ser Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp			
35	40	45	
val Ser Thr Ile Ser Gly Gly Ser Ala Thr Thr Tyr Thr Asp Ser			
50	55	60	
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Arg Ala Lys Asn Thr Leu			
65	70	75	80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr			
85	90	95	

0226-105-SEQ.ST25  
Cys Asn Ala Asp Val Ser Thr Gly Phe Arg Tyr Gln Arg Lys Asp Tyr  
100 105 110

Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro  
115 120 125

Lys Pro Gln Pro Ala Ala Ala Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp  
130 135 140

Leu Asn Gly Ala Ala  
145

<210> 10

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 10

gatgtgcagc tgcaggcgtc tggrrggagg

29

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 11

cgcctatcaag gtaccagttt a

21

<210> 12

<211> 45

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 12

catgcctatga ctcgcggccc agccggccat ggccgakgts cagct

45

0226-105-SEQ. ST25

<210> 13  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 13 ggactagttg cggccgctga ggagacggtg acctg 35

<210> 14  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 14 ggactagttg cggccgctgg ttgtggttt ggtgtcttgg g 41

<210> 15  
<211> 384  
<212> DNA  
<213> camelidae

<400> 15 atgggccat gtcagctgca ggcgtctgga ggaggcttgg tgcagccggg ggggtctctg 60  
agactctcct gtgcagcctc tggattcaact ttggagtatt atgccttagc ctggttccgc 120  
caggccccag ggaaggagcg tgtggggatt tcttgtatta gtgtactaa tggtcgcgca 180  
gactatgtag actccgtcaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaacgcg 240  
ttcttatctgc aaatgaacag cctgaaaacct gaggacacag ccgtttacta ctgtcagca 300  
gcaatgttga aatgccaatt aatgatgtcc tcttctaatt atacaaaaat ttggggccag 360  
ggcacccagg tcaccgtctc ctca 384

<210> 16  
<211> 381

0226-105-SEQ.ST25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 16  
camdaggccg aggtccgctg caggcgtctg ggggaggctt ggtgcagcct ggggggtctc 60  
tgacactctc ctgtatagcc tctggattca ctttgattta ttatagtgtg ggctggttcc 120  
gccaggcccc agggagaag cgtgagaggg tctcatgtac tggtccgaat ggtgaaagca 180  
caaactatgc agactccgtg aaggccgat tcaccatctc cagagacaac gccaagaaca 240  
cgccgtatct gcaaataaac acgctgaaac ctgacgacac tgccgttat tactgtcag 300  
cagtcgcact cccacaatgt acctggccc gtatggatga atatgactac tcaggccagg 360  
ggaccaggta cacggcttcc t 381

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 17  
atggccgatg tgcaagtgcg ggcgtctggg ggaggcttag tgcaagcctgg ggagtctctg 60  
acgctctcct gtgcagccta tggattcaca ttggattatt gtgcggtagg ctgggtccgc 120  
caggccccag ggaaggagcg cgagggagtc gcatgtattt gcagtagttt aggtcgcaca 180  
gattatgcag actccgtgaa gggccgattt accatctccc gagacaacgc caagaacacg 240  
atgtatctgc aaatgaacga cctgaaacct gaggacgcag ccgtttatta ctgtgcagcg 300  
aagatagggg gggcaatgtg tgtccaaat gagtatgact actggggcca ggggacccag 360  
gtcaccgtct cctcggaaacc caagacacca aagcca 396

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 396

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 18  
gtgcagctgc aggccgtctgg gggaggattt gtgcaggctg ggggctcttt gaatctctcc 60  
tgtgcagcct ctggacgcag cttcagtggc tatgcctgg gctgggtccg ccaggctccg 120  
ggaaaggagc gtgaattttt agagactatt agctggattt gtgaaaggac atactatgca 180  
gtgtccgtga agggccgatt caccatcacc agagacaacg ccaagaacac acttaatctg 240  
caaataaca gcctgaaacc tgaggacacg gccgtgtatt actgtgcggc caaagggttct 300

0226-105-SEQ.ST25

gatggtgatt acttcagcat ccagaaatat gacagctggg gccaggaaac ccaggtcacc 360  
 gtctccctcag accccaagac accaaaacca caacca 396

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 413

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 19  
 atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggattgg tgcaggctgg gggctctttg 60  
 aatctctcct gtgcagcctc tggacgcagc ttcaagtggct atgccttggg ctgggtccgc 120  
 caggctccgg ggaaggagcg tgaatttcta ggagcttata gctggattgg tggaaaggaca 180  
 tactatgcag tgtccgtgaa gggccgattc accatcacca gagacaacgc caagaacaca 240  
 cttaatctgc aaatgaacag cctgaaacctt gaggacacgg ccgtgttata ctgtgcggcc 300  
 aaaggttctg atggtgatta cttcagcatc cagaaatatg acagctgggg ccaggaaacc 360  
 caggtcaccg tctccctcaga acccaagaca ccaaaaccac aaccagcgcc cgcc 413

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 263

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 20  
 atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggcttgg tgcagcctgg gggttctccg 60  
 ggactctcct gtgcagcctc cggatttcacc tttaggacgt ctgacatgag ttgggtccgc 120  
 caggctccag ggaaggggct cgaatgggtc tcataatattt atagtggttag tggaaaggaaa 180  
 ctgtatgcgg actccgcgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaacacg 240  
 gtgtatctgc aaatgaacag cct 263

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 294

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

<400> 21  
 atggccgatg tgcagctgca ggcgtctggg ggaggcttgg tgcagcctgg gggttctccg 60  
 ggactctcct gtgcagcctc cggatttcacc tttaggacgt ctgacatgag ttgggtccgc 120  
 Page 11

0226-105-SEQ.ST25

caggctccag ggaagggcgt cgaatgggtc tcataatattg atagtggtag tggaaaggaaa 180  
 ctgttatgcgg actccgcgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaacacg 240  
 gtgttatctgc aaatgaacag cctgaaaccc gaggacacag gcgttttatta ctgt 294

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 127

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 22

Gly	Arg	Cys	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5				10					15		

Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Glu	Tyr
								25				30			

Tyr	Ala	Leu	Ala	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Val	Gly
						35		40			45				

Ile	Ser	Cys	Ile	Ser	Ser	Thr	Asn	Gly	Arg	Ala	Asp	Tyr	Val	Asp	Ser
						50		55		60					

Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ala	Phe
65				70					75		80				

Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
								85		90		95			

Cys	Ala	Ala	Ala	Met	Trp	Lys	Cys	Gln	Leu	Met	Met	Ser	Ser	Ser	Asn
							100		105		110				

Tyr	Thr	Lys	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser
						115		120			125			

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 23

Gly	Arg	Gly	Pro	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
1				5				10					15		

Gly Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ile Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr  
 20 25 30

Tyr Ser Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Glu Arg  
 35 40 45

Val Ser Cys Thr Gly Pro Asn Gly Glu Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser  
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Ala  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Ala Val Ala Leu Pro Gln Cys Thr Trp Ala Arg Met Asp Glu  
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Ser Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120 125

<210> 24

<211> 131

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 24

Ala Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Tyr Gly Phe Thr Leu Asp Tyr  
 20 25 30

Cys Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly  
 35 40 45

Val Ala Cys Ile Gly Ser Ser Leu Gly Arg Thr Asp Tyr Ala Asp Ser  
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Met  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Pro Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr  
 85 90 95

Cys Ala Ala Lys Ile Gly Gly Ala Met Cys Val Pro Asn Glu Tyr Asp  
 100 105 110

0226-105-SEQ.ST25  
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr  
115 120 125

Pro Lys Pro  
130

<210> 25

<211> 132

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 25

Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Asn Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Phe Ser Gly Tyr Ala  
20 25 30

Leu Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val Gly  
35 40 45

Ala Ile Ser Trp Ile Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Val Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Asn Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
85 90 95

Ala Lys Gly Ser Asp Gly Asp Tyr Phe Ser Ile Gln Lys Tyr Asp Ser  
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Glu Pro Lys Thr Pro  
115 120 125

Lys Pro Gln Pro  
130

<210> 26

<211> 97

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 26

0226-105-SEQ.ST25

Ala Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Pro Gly Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr  
 20 25 30

Ser Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp  
 35 40 45

Val Ser Tyr Ile Asp Ser Gly Ser Gly Arg Lys Leu Tyr Ala Asp Ser  
 50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val  
 65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr  
 85 90 95

## Cys

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 27

Ala Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Ala Gln Ala Gly  
 1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Asp Ser Ile  
 20 25 30

Asn Val Met Ala Trp Tyr Arg Pro Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu  
 35 40 45

Val Ala Ala Ile Ala Arg Asp Ala Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Leu  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Val Thr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Arg Met Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Asn Ala Glu Ala Leu Met His Thr Gln Phe Pro Arg His Tyr Trp Gly  
 100 105 110

0226-105-SEQ.ST25

Pro	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Thr	Pro	Lys	Pro
115							120					125			

Gln Pro  
130

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 381

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(381)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 28

gag	gtg	cag	ctg	cag	gcg	tct	ggg	ggg	ggc	ttg	gtg	gaa	cct	ggg	ggg
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Glu	Pro	Gly	Gly
1			5				10					15			

tct	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gaa	agc	atc	tgg	gtc	aat	gta
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Trp	Val	Asn	Val
	20				25						30				

atg	gac	tgg	tac	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	cag	cgc	gag	ttg	gtc	gca
Met	Asp	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Ala
	35			40						45					

gct	att	act	cgt	ggt	gtc	aca	aac	tat	gca	gac	tcc	gtg	aag	ggc	
Ala	Ile	Thr	Arg	Gly	Gly	Val	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly
	50				55				60						

cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aac	gcc	aag	aac	atg	atg	ttc	ctg	caa
Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Met	Met	Phe	Leu	Gln
	65			70				75			80				

atg	cac	agc	ctg	cta	cct	gag	gac	acg	gcc	gtc	tat	tat	tgc	cat	gcg
Met	His	Ser	Leu	Leu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Ala
	85				90						95				

cgt	aca	tgg	aga	gac	tat	tgg	ggc	cag	ggg	acc	cag	gtc	acg	tct	cct
Arg	Thr	Trp	Arg	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Ser	Pro
	100				105					110					

cca	gcg	gcc	gca	cat	cat	cat	cac	cat	cac	ggg	gcc	gca	gaa	caa
Pro	Ala	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His	Gly	Ala	Ala	Glu	Gln
	115						120				125			

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 127

&lt;212&gt; PRT

0226-105-SEQ.ST25

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 29

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Glu	Pro	Gly	Gly
1				5				10				15			

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Trp	Val	Asn	Val
				20				25				30			

Met	Asp	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val	Ala
					35		40			45					

Ala	Ile	Thr	Arg	Gly	Gly	Val	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly
					50		55			60					

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Met	Met	Phe	Leu	Gln
					65		70		75		80				

Met	His	Ser	Leu	Leu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Ala
					85			90				95			

Arg	Thr	Trp	Arg	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Ser	Pro
					100		105			110					

Pro	Ala	Ala	Ala	His	His	His	His	His	Gly	Ala	Ala	Glu	Gln		
					115		120			125					

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(357)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 30

gag	gtg	cag	ctg	cag	gcg	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gtg	cag	cct	ggg	ggg
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10				15			

tct	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gca	agc	atc	ttc	agt	atc	gat
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Ala	Ser	Ile	Phe	Ser	Ile	Asp
					20			25			30				

ggc	atg	ggc	tgg	tac	cgc	cag	gct	cca	gga	aag	cag	cgc	gag	ttg	gtc
															144

0226-105-SEQ.ST25

Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val			
35	40	45	
gca ggt att act agt ggt ggt agc aca aac tat gca gac tcc gtg aag			192
Ala Gly Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
50	55	60	
ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac atg atg ttc ctg			240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Phe Leu			
65	70	75	80
caa atg cgc agc ctg cta cct gag aac acg gcc gtc tat tac tgt cat			288
Gln Met Arg Ser Leu Leu Pro Glu Asn Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His			
85	90	95	
gcg cgt aca tgg aga gac tat tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc			336
Ala Arg Thr Trp Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val			
100	105	110	
tcc tca gcg gcc gca cat cat			357
Ser Ser Ala Ala Ala His His			
115			

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 31

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly			
1	5	10	15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Ser Ile Phe Ser Ile Asp		
20	25	30

Gly Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val			
35	40	45	

Ala Gly Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
50	55	60	

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Met Met Phe Leu			
65	70	75	80

Gln Met Arg Ser Leu Leu Pro Glu Asn Thr Ala Val Tyr Tyr Cys His		
85	90	95

Ala Arg Thr Trp Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val		
100	105	110

Ser Ser Ala Ala Ala His His		
115		

0226-105-SEQ.ST25

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 348

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(348)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 32

gag	gtg	cag	ctg	cag	gcg	tct	ggg	gga	gga	ttg	gtg	cag	acc	ggg	ggc		48
Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Thr	Gly	Gly		
1				5					10					15			

tct	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gta	gcc	tct	gga	cgc	acc	ttc	agc	agc	agc	tac		96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr			
					20				25				30					

gcc	atg	ggc	tgg	ttc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	gag	cga	gag	ttt	gtt		144
Ala	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val		
					35			40		45							

gca	gct	gtt	agc	cag	agt	ggt	gtt	cgt	aca	aac	tat	gca	gac	tcc	gtg		192
Ala	Ala	Val	Ser	Gln	Ser	Gly	Val	Arg	Thr	Asn	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
					50			55		60							

aag	ggc	cga	ttc	acc	atc	tcc	aga	gac	aac	gcc	aag	ttc	acg	gtg	tat		240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Phe	Thr	Val	Tyr		
					65			70		75			80				

ctg	caa	acg	aac	agc	ctg	aaa	cct	gag	gac	acg	gcc	ctt	tat	tac	tgt		288
Leu	Gln	Thr	Asn	Ser	Leu	Lys	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys		
					85			90		95							

gca	gcc	act	acg	aaa	ccc	ttt	ttg	ggg	gta	cga	atg	ttt	caa	cca	gag		336
Ala	Ala	Thr	Thr	Lys	Pro	Phe	Leu	Gly	Val	Arg	Met	Phe	Gln	Pro	Glu		
					100			105		110							

tac	tgg	ggc	cag														348
Tyr	Trp	Gly	Gln														
			115														

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 116

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 33

Glu	Val	Gln	Leu	Gln	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Thr	Gly	Gly	
1				5					10			15				

0226-105-SEQ.ST25

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

Ala Ala Val Ser Gln Ser Gly Val Arg Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Phe Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Thr Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Thr Thr Lys Pro Phe Leu Gly Val Arg Met Phe Gln Pro Glu  
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln  
 115

<210> 34

<211> 360

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<223>

<400> 34

gat gtc cag ctg cag gcg tct gga gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg	48
Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga agc atc ttc agt aac cat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His	
20 25 30	

gcc atg ggc tgg tac cgc cag cct cca ggg aag cag cgc gag ttc gtc	144
Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val	
35 40 45	

gca aat att ttt agt ggc ggt cgc ata aac tat gca gac ttc gtg aag	192
Ala Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys	
50 55 60	

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aat acg gtg tat ctg	240
---	-----

0226-105-SEQ.ST25

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu			
65	70	75	80
caa atg aac aaa ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat ccc tgt aat			288
Gln Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Pro Cys Asn			
85		90	95
gct tgg agg tta ggt tat gac tat tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc			336
Ala Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr			
100		105	110
gtc tcc tca gct gcc gca cat cat			360
Val Ser Ser Ala Ala Ala His His			
115		120	

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 35

Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His		
20	25	30

Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val		
35	40	45

Ala Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys		
50	55	60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu			
65	70	75	80

Gln Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Pro Cys Asn			
85		90	95

Ala Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr			
100		105	110

Val Ser Ser Ala Ala Ala His His		
115		120

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

0226-105-SEQ.ST25

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(357)

&lt;223&gt;

<400> 36		
gat gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg		48
Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga atc gtc ttc aga gtc agt		96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Val Phe Arg Val Ser		
20 25 30		
acc atg ggc tgg tac cgc cag gct cca ggg aag cag cgc gag ttg gtc		144
Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val		
35 40 45		
gca act att tct agt ggt ggt agt aca aac tat gca gac tcc gtg aag		192
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
50 55 60		
ggc cga ttc acc atc tac aga gac aac gcc aag aac acg gtg tat ctg		240
Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu		
65 70 75 80		
caa atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtc tat tac tgt aat		288
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn		
85 90 95		
gca aat aca gga ctc cgt acc ctt tcg ttc tgg ggc cag ggg acc cag		336
Ala Asn Thr Gly Leu Arg Thr Leu Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln		
100 105 110		
gtc acc gtc tcc tca gcg gcc		357
Val Thr Val Ser Ser Ala Ala		
115		

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 37

Asp Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Val Phe Arg Val Ser	
20 25 30	

Thr Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val	
35 40 45	

0226-105-SEQ. ST25

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Tyr Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn  
85 90 95

Ala Asn Thr Gly Leu Arg Thr Leu Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln  
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ala  
115

<210> 38

<211> 396

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(396)

<223>

<400> 38

gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga gga ttg gtg cag gct ggg ggc 48  
 Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gaa cgc acc ttc agt aac gct 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Asn Ala  
 20 25 30

cgc atg gcc tgg ttc cgc cag gct cca gga cag gag cgt gag ttt gta 144  
 Arg Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Phe Val  
           35                40                45

```

gct att agc tgg agt ggt act acc acg aac tat gca gac tcc gtg      192
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50          55          60

```

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aat acg gtg tat  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aag cct gag gac acg gcc gtt tat tac tgc 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                  90                  95

gca gca gat ggt tcc tgg cg<sup>g</sup> gga gtc tgc aac aat gtg tat gac tac 336  
Page 23

0226-105-SEQ.ST25

Ala Ala Asp Gly Ser Trp Arg Gly Val Cys Asn Asn Val Tyr Asp Tyr  
 100 105 110

tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc gca cat cat 384  
 Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala His His  
 115 120 125

cat cac cat cac 396  
 His His His His  
 130

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 132

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 39

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Glu Arg Thr Phe Ser Asn Ala  
 20 25 30

Arg Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Gln Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Asp Gly Ser Trp Arg Gly Val Cys Asn Asn Val Tyr Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala His His  
 115 120 125

His His His His  
 130

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 366

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

0226-105-SEQ.ST25

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (366)

<223>

<400> 40		48
gag gtg cag ctg cag gcg tct gga gga gga ttg gtg cag gct ggg ggc		
Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly		
1 5 10 15		
tct ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ggc acc ttg agt agc tat		96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Leu Ser Ser Tyr		
20 25 30		
gtc atg ggc tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag gag cgt gag att gta		144
Val Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ile Val		
35 40 45		
gca gct att agg tct agt ggt agc gca tgg tat gca gac tcc gtg cag		192
Ala Ala Ile Arg Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr Ala Asp Ser Val Gln		
50 55 60		
ggc cga ttc acc atc tcc aga gac ggc gcc agg aac acg gtg tat ctg		240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu		
65 70 75 80		
caa atg aac agc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtt tac tac tgt gca		288
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
85 90 95		
gca aag aaa gga att acg gtc ttt act cgt gac tcg tcg tat gac tac		336
Ala Lys Lys Gly Ile Thr Val Phe Thr Arg Asp Ser Ser Tyr Asp Tyr		
100 105 110		
tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc		366
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser		
115 120		

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 41

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Thr Leu Ser Ser Tyr  
20 25 30

Val Met Gly Trp Phe Arg Gin Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Ile Val  
35 40 45

0226-105-SEQ.ST25

Ala Ala Ile Arg Ser Ser Gly Ser Ala Trp Tyr Ala Asp Ser Val Gln  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala  
 85 90 95

Ala Lys Lys Gly Ile Thr Val Phe Thr Arg Asp Ser Ser Tyr Asp Tyr  
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser  
 115 120

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 384

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(384)

&lt;223&gt;

<400> 42  
 cgt gtc cag ctg cag gcg tct gga gga gga ttg gtg cag gct ggg ggc 48  
 Arg Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

tca ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga cgc acg ctc agt agt tat 96  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser Ser Tyr  
 20 25 30

gcc atg ggc tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag gat cgt gag ttt gta 144  
 Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

gca gct att agc tgg agt ggt act agg aca tcg tat gcg gac tcc gtg 192  
 Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac acg gta tat 240  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg aaa ccc gag gac acg gcc gtt tat tac tgt 288  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

gcg atg cgt tca atg cgt tcc aac ctc tat acc gtc tat gag gcc ccg 336  
 Page 26

0226-105-SEQ.ST25

Ala Met Arg Ser Met Arg Ser Asn Leu Tyr Thr Val Tyr Glu Ala Pro  
 100 105 110

cat gac tat gac tac tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca 384  
 His Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 128

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 43

Arg Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser Ser Tyr  
 20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Thr Arg Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Met Arg Ser Met Arg Ser Asn Leu Tyr Thr Val Tyr Glu Ala Pro  
 100 105 110

His Asp Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 357

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; camelidae

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(357)

0226-105-SEQ.ST25

&lt;223&gt;

<400> 44  
gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga gga ttg gtg cag gct ggg ggc 48  
Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

tct ctg aga ctc gcc tgt gcg gcc tct gga cgc acc ttc agg agc tat 96  
Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Arg Ser Tyr  
20 25 30

gcc atg ggc tgg ttc cgc cag gct cca gga aag gag cgc gag ggg gtc 144  
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
35 40 45

tca tgt att agt agt aat gat ggt agc aca tat tat gca gac tcc gtg 192  
Ser Cys Ile Ser Ser Asn Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc gaa aac acg atg tat 240  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Thr Met Tyr  
65 70 75 80

ctg caa atg aac ggc ctg aaa cct gag gac acg gcc gtt tat tac tgt 288  
Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

gct tca gca aaa tgg tat agt gga cgt ttc tac cgg agt gcc gcg gat 336  
Ala Ser Ala Lys Trp Tyr Ser Gly Arg Phe Tyr Arg Ser Ala Ala Asp  
100 105 110 115

gat tgt gcc cct tac gag tat 357  
Asp Cys Ala Pro Tyr Glu Tyr  
115

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; camelidae

&lt;400&gt; 45

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Arg Ser Tyr  
20 25 30

Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val  
35 40 45

Ser Cys Ile Ser Ser Asn Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Glu Asn Thr Met Tyr  
65 70 75 80

0226-105-SEQ.ST25

Leu Gln Met Asn Gly Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ser Ala Lys Trp Tyr Ser Gly Arg Phe Tyr Arg Ser Ala Ala Asp  
 100 105 110

Asp Cys Ala Pro Tyr Glu Tyr  
 115

<210> 46

<211> 354

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(354)

<223>

<400> 46		
tgt gag ctg cag gcg tct ggg gga ggc ttg gtg cag cct ggg ggg tct		48
Cys Glu Leu Gln Ala Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser		
1 5 10 15		
ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga agc atc ttc agt aac cat gcc		96
Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His Ala		
20 25 30		
atg ggc tgg tac cgc cag cct cca ggg aag cag cgc gag ttc gtc gca		144
Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val Ala		
35 40 45		
aat att ttt agt ggc ggt cgc ata aac tat gca gac ttc gtg aag ggc		192
Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly		
50 55 60		
cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac acg gtg tat ctg caa		240
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln		
65 70 75 80		
atg aac aaa ctg aaá cct gag gac acg gcc gtc tat ctc tgt aat gcg		288
Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Asn Ala		
85 90 95		
tgg agg tta ggt tat gac tac tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc		336
Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val		
100 105 110		
tcc tca gcg gcc gca cat		354
Ser Ser Ala Ala Ala His		
115		

<210> 47 0226-105-SEQ.ST25

<211> 118

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 47

Cys Glu Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Ile Phe Ser Asn His Ala  
20 25 30

Met Gly Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gln Arg Glu Phe Val Ala  
35 40 45

Asn Ile Phe Ser Gly Gly Arg Ile Asn Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly  
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln  
65 70 75 80

Met Asn Lys Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys Asn Ala  
85 90 95

Trp Arg Leu Gly Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
100 105 110

Ser Ser Ala Ala Ala His  
115

<210> 48

<211> 375

<212> DNA

<213> camelidae

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(375)

<223>

<400> 48  
gag gtg cag ctg cag gcg tct ggg gga gga ttg ctg cag gct ggg gac 48  
Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Leu Gln Ala Gly Asp  
1 5 10 15

0226-105-SEQ. ST25

tct	ctg	aga	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tct	gga	cgc	acc	ttc	agt	aca	tat	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Arg	Thr	Phe	Ser	Thr	Tyr	96
20								25						30		

aac atg gcg tgg ttc cgc cag gct cca ggg aag gag cgt gag ctt gta  
Asn Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val 144  
35 40 45

```

gca gct atc act tgg agt gga ggt aca tac tat gca gac tcc gtg aag      192
Ala Ala Ile Thr Trp Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
   50          55          60

```

ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aac gcc aag aac acg gta tct ctg  
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser Leu  
 65 70 75 80

caa atg gac agc ctg aaa ccc gag gac acg gcc gtt tat tac tgt aca  
 Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr  
 85 90 95 288

```
cga tcg cgg cgt gct agt tac ttc ggg gac ccc act gac ttt cgt tcc      336
Arg Ser Arg Arg Ala Ser Tyr Phe Gly Asp Pro Thr Asp Phe Arg Ser
          100           105           110
```

tgg ggc cag ggg acc cag gtc acc gtc tcc tca gcg gcc  
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala  
115 120 125 375

<210> 49

<211> 125

<212> PRT

<213> camelidae

<400> 49

Glu Val Gln Leu Gln Ala Ser Gly Gly Gly Leu Leu Gln Ala Gly Asp  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Thr Tyr  
20 25 30

Asn Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Thr Trp Ser Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Ser Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asp Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr  
85 90 95

Arg Ser Arg Arg Ala Ser Tyr Phe Gly Asp Pro Thr Asp Phe Arg Ser  
100 105 110

0226-105-SEQ.ST25

Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala  
115 120 125

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 50

caggaaacag ctaggacc

18

<210> 51

<211> 21

<212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorce

<400> 51

cttttctgag atgagtttt g

21

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
27 mai 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 2004/044204 A3**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
**C07K 14/47**, 16/18,  
G01N 33/68, A61K 39/395, A61P 25/28

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/003319

(22) Date de dépôt international :  
6 novembre 2003 (06.11.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/13866 6 novembre 2002 (06.11.2002) FR

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : INSTITUT PASTEUR [FR/FR]; 28 rue du Docteur Roux,  
F-75724 Paris cedex 15 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel-Ange, F-75794 Paris cedex 16 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : ROUGEON, François [FR/FR]; 36 rue Fontaine, F-92310 Sevres (FR). LAFAYE, Pierre [FR/FR]; 31 Boulevard Camelinat, F-92240 MALAKOFF (FR).

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36, rue de St Pétersbourg, F-75008 Paris (FR).

(84) États désignés (*regional*) : brevet ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 10 septembre 2004

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

(54) Title: VARIABLE FRAGMENTS OF SINGLE-CHAIN CAMELIDE ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR DIAGNOSING AND TREATING VARIOUS PATHOLOGIES

(54) Titre : FRAGMENTS VARIABLES D'ANTICORPS DE CAMELIDES A CHAINE UNIQUE ET LEURS APPLICATIONS POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DE PATHOLOGIES DIVERSES.

(57) Abstract: The invention concerns variable fragments of single-chain camelide antibodies directed against amyloid beta-peptide 1-42 as well as against phosphorylcholine. The invention also concerns uses thereof for treating and diagnosing pathologies associated with molecules identified by said antibodies, and in particular neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease and infectious diseases induced by pathogens (viruses or bacteria).

(57) Abrégé : Fragments variables d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigée contre le peptide B-amyloïde 1-42 ainsi que contre la phosphorylcholine. Est également décrit, l'application pour le traitement ou le diagnostic des pathologies associées aux molécules reconnues par ces anticorps, et notamment les maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer ou des maladies infectieuses induites par des agents pathogènes (virus ou bactéries).

WO 2004/044204 A3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/FR 03/03319A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/68 A61K39/395 A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, SCISEARCH

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VAN DER LINDEN R ET AL: "Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of <i>Lama glama</i> " JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 240, no. 1-2, June 2000 (2000-06), pages 185-195, XP004201577 ISSN: 0022-1759 page 186, right-hand column, paragraph 1 page 188, right-hand column, paragraph 2 -page 191, right-hand column, paragraph 3; figure 3; table 2  -/-	1,19,22, 23,27, 30,31,34

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  7 July 2004	Date of mailing of the international search report  27.07.2004
Name and mailing address of the ISA  European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Steffen, P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/03319

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 954 978 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 10 November 1999 (1999-11-10)  examples 1,2,8 ---	1,19,22, 23, 25-27, 30,31,34
X	WO 00/65057 A (UNILEVER PLC ;LEVER HINDUSTAN LTD (IN); UNILEVER NV (NL)) 2 November 2000 (2000-11-02) page 8, line 25 -page 9, line 1; examples 1,2 ---	1,19,22, 23,26, 27,30
X	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 page 171 -page 175; tables 1,2 ---	1,19,22, 23,25,26
X	HAMERS-CASTERMAN C ET AL: "NATURALLY OCCURRING ANTIBODIES DEVOID OF LIGHT CHAINS" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 363, 3 June 1993 (1993-06-03), pages 446-448, XP002048619 ISSN: 0028-0836 page 446 -page 448; figures 1,2 ---	1
P,X	WO 03/062415 A (DEKKER SYLVIA ;DRABEK DUBRAVKA (NL); ERASMUS UNIVERSITY (NL); GROS) 31 July 2003 (2003-07-31) page 12 -page 13 page 36 -page 43 ---	1,30
A	MARTIN F ET AL: "Affinity selection of a camelized VH domain antibody inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 5, May 1997 (1997-05), pages 607-614, XP002117441 ISSN: 0269-2139 the whole document ---	
		-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/03319

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARBABI GHARROUDI M ET AL: "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 414, no. 3, 15 September 1997 (1997-09-15), pages 521-526, XP004261105 ISSN: 0014-5793 the whole document ---	
A	MUYLDERMANS S: "Single domain camel antibodies: current status." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. NETHERLANDS JUN 2001, vol. 74, no. 4, June 2001 (2001-06), pages 277-302, XP002236934 ISSN: 0168-1656 cited in the application page 286, left-hand column, paragraph 3 -page 290, right-hand column, paragraph 1; figure 5; table 1 ---	
A	WO 00/72880 A (SCHENK DALE B ;YEDNOCK TED (US); BARD FREDERIQUE (US); NEURALAB LT) 7 December 2000 (2000-12-07) page 68 -page 69 ---	1,12-18
A	WO 01/62801 A (VASQUEZ MAXIMILIANO ;BALES KELLY R (US); PAUL STEVEN M (US); DEMAT) 30 August 2001 (2001-08-30) example 2 ---	1,12-18
A	BARD F ET AL: "Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 6, no. 8, August 2000 (2000-08), pages 916-919, XP002154518 ISSN: 1078-8956 cited in the application table 1 ---	1,12-18
A	FRENKEL D ET AL: "MODULATION OF ALZHEIMER'S BETA-AMYLOID NEUROTOXICITY BY SITE-DIRECTED SINGLE-CHAIN ANTIBODY" NEUROIMMUNOMODULATION, KARGER, BASEL,, CH, vol. 6, no. 6, November 1999 (1999-11), page 444 XP008000881 ISSN: 1021-7401 abstract ---	1,12-18
	-/-	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/03319

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DUMOULIN M ET AL: "A single-domain antibody fragment that stabilises the native state of two amyloidogenic lysozyme variants and hence prevents aggregation." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 30, no. 3, 2002, page A93 XP002236935 676th Meeting of the Biochemical Society; Edinburgh, UK; April 08-10, 2002 ISSN: 0300-5127 abstract ----- SOLOMON B: "Immunotherapeutic strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease." DNA AND CELL BIOLOGY. UNITED STATES NOV 2001, vol. 20, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 697-703, XP002236936 ISSN: 1044-5498 page 701, left-hand column, paragraph 4 -page 702, left-hand column, paragraph 1 -----	1,12-18
A		1,12-18

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/FR 03/03319

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**see supplementary sheet**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.



No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/FR 03/03319

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

**1. claims: 1 (partially), 19-36**

Use of single-chain camel antibodies to pathogens that do not secrete toxins or do not contain HCV protease NS3 for detecting said pathogen; variable fragment of single-chain camel antibodies to pathogens that do not secrete toxins and can bind to a bacterial wall adhesion molecule, particularly phosphorylcholine; cDNA coding for a fragment of this kind; vectors and host cells, and compositions containing said cDNA and/or variable fragment; and uses of said fragments and cDNA.

**2. claims: 1 (partially), 12-18**

Use of single-chain camel antibodies to beta-amyloid peptide 1-42 for detecting a disease including deposits of an insoluble amyloid substance; variable fragment of single-chain camel antibodies to beta-amyloid peptide 1-42; cDNA and cDNA library coding for a fragment of this kind; vectors and host cells, and compositions containing said cDNA and/or variable fragment; and uses of said fragments and cDNA.

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/03319

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)		Publication date
EP 0954978	A	10-11-1999	EP 0954978 A1 AU 2729599 A WO 9946300 A1 EP 1062245 A1 US 6517829 B1		10-11-1999 27-09-1999 16-09-1999 27-12-2000 11-02-2003
WO 0065057	A	02-11-2000	AU 4120200 A BR 0009866 A CA 2370351 A1 CN 1351662 T WO 0065057 A1 EP 1169453 A1 ID 30380 A US 2003165511 A1 US 6528056 B1 ZA 200107822 A		10-11-2000 08-01-2002 02-11-2000 29-05-2002 02-11-2000 09-01-2002 29-11-2001 04-09-2003 04-03-2003 23-09-2002
WO 03062415	A	31-07-2003	WO 03062415 A2		31-07-2003
WO 0072880	A	07-12-2000	AU 5303100 A BG 106241 A BR 0011000 A CA 2370311 A1 CN 1359301 T CZ 20013824 A3 DE 10084643 T0 EE 200100626 A EP 1185298 A2 GB 2368794 A HU 0201250 A2 JP 2003517461 T NO 20015773 A NZ 515403 A SK 16982001 A3 TR 200103447 T2 TR 200202231 T2 WO 0072880 A2 US 6710226 B1 US 6750324 B1 US 6743427 B1 ZA 200109487 A		18-12-2000 30-08-2002 19-02-2002 07-12-2000 17-07-2002 13-11-2002 11-07-2002 17-02-2003 13-03-2002 15-05-2002 28-08-2002 27-05-2003 25-01-2002 28-05-2004 06-11-2002 22-04-2002 21-11-2002 07-12-2000 23-03-2004 15-06-2004 01-06-2004 17-02-2003
WO 0162801	A	30-08-2001	AU 4178601 A BR 0108676 A CA 2400559 A1 CN 1426423 T CZ 20022851 A3 DE 1257584 T1 EP 1257584 A2 ES 2184660 T1 HU 0204074 A2 JP 2003523764 T NO 20023957 A NZ 520800 A SK 12212002 A3 TR 200202799 T3 WO 0162801 A2		03-09-2001 07-01-2003 30-08-2001 25-06-2003 17-09-2003 28-05-2003 20-11-2002 16-04-2003 28-03-2003 12-08-2003 22-10-2002 30-04-2004 07-10-2003 21-03-2003 30-08-2001

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande Internationale No  
PCT/FR 03/03319

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C07K14/47 C07K16/18 G01N33/68 A61K39/395 A61P25/28

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, MEDLINE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, SCISEARCH

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	VAN DER LINDEN R ET AL: "Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of <i>Lama glama</i> " JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 240, no. 1-2, juin 2000 (2000-06), pages 185-195, XP004201577 ISSN: 0022-1759 page 186, colonne de droite, alinéa 1 page 188, colonne de droite, alinéa 2 -page 191, colonne de droite, alinéa 3; figure 3; tableau 2 ----- -/-	1, 19, 22, 23, 27, 30, 31, 34

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

7 juillet 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

27.07.2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Steffen, P

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 03/03319

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 954 978 A (UNILEVER PLC ;UNILEVER NV (NL)) 10 novembre 1999 (1999-11-10)  exemples 1,2,8 —	1,19,22, 23, 25-27, 30,31,34
X	WO 00/65057 A (UNILEVER PLC ;LEVER HINDUSTAN LTD (IN); UNILEVER NV (NL)) 2 novembre 2000 (2000-11-02) page 8, ligne 25 -page 9, ligne 1; exemples 1,2 —	1,19,22, 23,26, 27,30
X	DAVIES J ET AL: "Affinity improvement of single antibody VH domains: residues in all three hypervariable regions affect antigen binding" IMMUNOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV, NL, vol. 2, no. 3, 1 septembre 1996 (1996-09-01), pages 169-179, XP004070292 ISSN: 1380-2933 page 171 -page 175; tableaux 1,2 —	1,19,22, 23,25,26
X	HAMERS-CASTERMAN C ET AL: "NATURALLY OCCURRING ANTIBODIES DEVOID OF LIGHT CHAINS" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 363, 3 juin 1993 (1993-06-03), pages 446-448, XP002048619 ISSN: 0028-0836 page 446 -page 448; figures 1,2 —	1
P,X	WO 03/062415 A (DEKKER SYLVIA ;DRABEK DUBRAVKA (NL); ERASMUS UNIVERSITY (NL); GROS) 31 juillet 2003 (2003-07-31) page 12 -page 13 page 36 -page 43 —	1,30
A	MARTIN F ET AL: "Affinity selection of a camelized VH domain antibody inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease" PROTEIN ENGINEERING, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 10, no. 5, mai 1997 (1997-05), pages 607-614, XP002117441 ISSN: 0269-2139 Le document en entier —	
		-/-

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 03/03319

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	ARBABI GHARROUDI M ET AL: "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies" FEBS LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 414, no. 3, 15 septembre 1997 (1997-09-15), pages 521-526, XP004261105 ISSN: 0014-5793 le document en entier ---	
A	MUYLDERMANS S: "Single domain camel antibodies: current status." JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. NETHERLANDS JUN 2001, vol. 74, no. 4, juin 2001 (2001-06), pages 277-302, XP002236934 ISSN: 0168-1656 cité dans la demande page 286, colonne de gauche, alinéa 3 -page 290, colonne de droite, alinéa 1; figure 5; tableau 1 ---	
A	WO 00/72880 A (SCHENK DALE B ;YEDNOCK TED (US); BARD FREDERIQUE (US); NEURALAB LT) 7 décembre 2000 (2000-12-07) page 68 -page 69 ---	1,12-18
A	WO 01/62801 A (VASQUEZ MAXIMILIANO ;BALES KELLY R (US); PAUL STEVEN M (US); DEMAT) 30 août 2001 (2001-08-30) exemple 2 ---	1,12-18
A	BARD F ET AL: "Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 6, no. 8, août 2000 (2000-08), pages 916-919, XP002154518 ISSN: 1078-8956 cité dans la demande tableau 1 ---	1,12-18
A	FRENKEL D ET AL: "MODULATION OF ALZHEIMER'S BETA-AMYLOID NEUROTOXICITY BY SITE-DIRECTED SINGLE-CHAIN ANTIBODY" NEUROIMMUNOMODULATION, KARGER, BASEL, CH, vol. 6, no. 6, novembre 1999 (1999-11), page 444 XP008000881 ISSN: 1021-7401 abrégé ---	1,12-18
		-/-

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 03/03319

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>DUMOULIN M ET AL: "A single-domain antibody fragment that stabilises the native state of two amyloidogenic lysozyme variants and hence prevents aggregation." BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, vol. 30, no. 3, 2002, page A93 XP002236935 676th Meeting of the Biochemical Society; Edinburgh, UK; April 08-10, 2002 ISSN: 0300-5127 abrégé</p> <p>---</p> <p>SOLOMON B: "Immunotherapeutic strategies for prevention and treatment of Alzheimer's disease." DNA AND CELL BIOLOGY. UNITED STATES NOV 2001, vol. 20, no. 11, novembre 2001 (2001-11), pages 697-703, XP002236936 ISSN: 1044-5498</p> <p>page 701, colonne de gauche, alinéa 4</p> <p>-page 702, colonne de gauche, alinéa 1</p> <p>-----</p>	1,12-18
A		1,12-18

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR 03/03319

### Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications n°s \_\_\_\_\_ se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
  
2.  Les revendications n°s \_\_\_\_\_ se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
  
3.  Les revendications n°s \_\_\_\_\_ sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

### Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1.  Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
  
2.  Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtent ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
  
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s \_\_\_\_\_
  
4.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s \_\_\_\_\_

#### Remarque quant à la réserve

Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.  
 Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

**SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

**1. revendications: 1 (en partie), 19-36**

Utilisation d'anticorps à chaîne unique de camélidés dirigés contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxines ou ne contenant pas la protéase NS3 de l'HCV pour la détection du dit agent pathogène. Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigé contre des agents pathogènes ne sécrétant pas de toxines et capable de se lier à une molécule d'adhésion de la paroi bactérienne et plus particulièrement la phosphorylcholine. ADNc codant pour un tel fragment, vecteurs et cellules hôtes et compositions contenant un tel ADNc et/ou fragment variable ainsi que utilisations des dits fragments et ADNc.

**2. revendications: 1 (en partie); 12-18**

Utilisation d'anticorps à chaîne unique de camélidés dirigés contre le peptide bêta-amyoïde 1-42 pour la détection d'une maladie comprenant des dépôts de substance amyloïdes insolubles. Fragment variable d'anticorps de camélidés à chaîne unique dirigé contre le peptide bêta-amyoïde 1-42. ADNc et banque d'ADNc codant pour un tel fragment, vecteurs et cellules hôtes et compositions contenant un tel ADNc et/ou fragment variable ainsi que utilisations des dits fragments et ADNc.

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Demande Internationale No

PCT/FR 03/03319

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
EP 0954978	A	10-11-1999	EP 0954978 A1 AU 2729599 A WO 9946300 A1 EP 1062245 A1 US 6517829 B1		10-11-1999 27-09-1999 16-09-1999 27-12-2000 11-02-2003
WO 0065057	A	02-11-2000	AU 4120200 A BR 0009866 A CA 2370351 A1 CN 1351662 T WO 0065057 A1 EP 1169453 A1 ID 30380 A US 2003165511 A1 US 6528056 B1 ZA 200107822 A		10-11-2000 08-01-2002 02-11-2000 29-05-2002 02-11-2000 09-01-2002 29-11-2001 04-09-2003 04-03-2003 23-09-2002
WO 03062415	A	31-07-2003	WO 03062415 A2		31-07-2003
WO 0072880	A	07-12-2000	AU 5303100 A BG 106241 A BR 0011000 A CA 2370311 A1 CN 1359301 T CZ 20013824 A3 DE 10084643 T0 EE 200100626 A EP 1185298 A2 GB 2368794 A HU 0201250 A2 JP 2003517461 T NO 20015773 A NZ 515403 A SK 16982001 A3 TR 200103447 T2 TR 200202231 T2 WO 0072880 A2 US 6710226 B1 US 6750324 B1 US 6743427 B1 ZA 200109487 A		18-12-2000 30-08-2002 19-02-2002 07-12-2000 17-07-2002 13-11-2002 11-07-2002 17-02-2003 13-03-2002 15-05-2002 28-08-2002 27-05-2003 25-01-2002 28-05-2004 06-11-2002 22-04-2002 21-11-2002 07-12-2000 23-03-2004 15-06-2004 01-06-2004 17-02-2003
WO 0162801	A	30-08-2001	AU 4178601 A BR 0108676 A CA 2400559 A1 CN 1426423 T CZ 20022851 A3 DE 1257584 T1 EP 1257584 A2 ES 2184660 T1 HU 0204074 A2 JP 2003523764 T NO 20023957 A NZ 520800 A SK 12212002 A3 TR 200202799 T3 WO 0162801 A2		03-09-2001 07-01-2003 30-08-2001 25-06-2003 17-09-2003 28-05-2003 20-11-2002 16-04-2003 28-03-2003 12-08-2003 22-10-2002 30-04-2004 07-10-2003 21-03-2003 30-08-2001